

ANA SALOMÉ BAPTISTA OLIVEIRA LEITE

**APLICAÇÃO DE UM CASO PRÁTICO DE DOENÇAS
PROFISSIONAIS: RELEVÂNCIA MÉDICO-LEGAL**

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Medicina Legal submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto

Orientador – Professora Doutora Elisabete
Cunha

Categoria – Professora Adjunta

Afiliação – Escola Superior de
Enfermagem da Universidade do Porto

À memória dos meus avós

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Mónica Cunha, por todo o apoio, orientação e disponibilidade. Pelas críticas e sugestões dadas em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho, sempre com o objetivo de enriquecer o mesmo. Não existem palavras para expressar e transmitir todo o meu reconhecimento e gratidão. Um grande e sentido beijinho, e o meu sincero obrigado.

À Sr^a. Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa, pela simpatia, compreensão e partilha dos seus valiosos ensinamentos.

Ao Sr. Professor Doutor Pinto da Costa, pela inspiração dada ao longo de todo este percurso. Pela sabedoria, humor e capacidade de transmitir os seus conhecimentos.

À Dr^a. Daniela do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) pela simpatia e explicações acerca do SEM durante todo processo de investigação.

À minha amiga, Filipa Amaro, colega de licenciatura, pós-graduação e mestrado, agradeço todo o apoio, amizade, companheirismo e partilha de saberes durante todo este processo.

Aos meus pais, sem eles não seria possível realizar este curso, agradeço por me terem ajudado financeiramente e psicologicamente. Obrigado por toda a confiança, apoio, amor, compreensão, força, vontade de vencer, inspiração e sacrifícios prestados. Sem vocês nunca conseguiria ter chegado até aqui. Obrigado por sempre terem acreditado em mim. São os melhores pais do mundo!

Ao meu irmão, Dudu, pelo apoio e amor incondicional desde sempre.

Ao meu namorado, Bernardo, pelo apoio inesgotável manifestado ao longo de todos estes anos, nos bons e nos maus momentos. Pela amizade e amor. Por toda a paciência que sempre tiveste comigo, e por todos os incentivos para nunca desistir. Sem ti tudo teria sido muito mais difícil.

Um beijo especial à minha avó Manuela, e à memória dos meus avós, Adelaide, Isauro e Eduardo.

A todos os familiares e amigos, que se mostraram disponíveis e me apoiaram durante esta etapa atribulada, o meu muito obrigado.

Agradeço também a todos os que não foram mencionados particularmente, e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu obrigado a todos!

RESUMO

Os metais pesados são elementos quimicamente reativos e bio-acumulativos cujo organismo não é capaz de eliminar. Esta característica, aliada à sua potencial toxicidade, distingue-os de outros agentes tóxicos. O excesso de metais pesados que fazem naturalmente parte dos organismos, como o cobre (Cu) ou zinco (Zn), ou o contacto com metais pesados não intrínsecos ao Homem, pode provocar efeitos nocivos, nomeadamente neoplasias. A exposição aos metais pesados é uma contaminação silenciosa, à qual estamos expostos diariamente seja pela ocupação laboral, ingestão de água contaminada ou inalação de vapores tóxicos. Alguns metais continuam a ser utilizados, inclusivamente, em tratamentos médicos de foro oncológico, tratamentos dentários através de amálgamas e ainda em meios de diagnóstico, como no caso da imagiologia.

As doenças profissionais são, atualmente, uma problemática cada vez mais presente nos nossos dias. Na Tabela Nacional de Incapacidades (TNI) estão contemplados, como possíveis causadores destas doenças, três metais: o mercúrio (Hg), o chumbo (Pb) e o arsénio (As).

O objetivo deste estudo visou determinar qualitativamente e semi-quantitativamente a presença de metais pesados em amostras de cabelo de uma população alvo. Para a realização deste estudo utilizou-se o método de Microscopia Eletrónica de Varrimento acoplado à Microanálise de Raios-X (SEM-XRM), que fornece informações sobre a morfologia e analisa qualitativa e semi-quantitativamente uma determinada amostra. Esta metodologia é um versátil instrumento para a observação e análise de características micro-estruturais. Através desta técnica é possível detetar, desde que numa concentração superior a 0,1-0,3% em massa, a presença de metais pesados numa amostra.

Pela aplicabilidade desta técnica na identificação de metais em diferentes tipos de amostras, esta metodologia adquire uma forte importância médico-legal.

Neste trabalho observou-se a presença de metais pesados e terras raras nas amostras em estudo, o que nos poderá indicar que a exposição crónica desta população a esses mesmos metais potencia processos inflamatórios e desse modo carcinogénese, pelo stress oxidativo causado.

ABSTRACT

Heavy metals are chemically reactive and bio-accumulative elements whose body is unable to eliminate. This feature, combined with its potential toxicity, distinguishes them from other toxic agents. The excess of heavy metals that are naturally part of organisms, such as copper (Cu) or zinc (Zn), or contact with heavy metals not intrinsic to Man, can provoke harmful effects including neoplasia. Exposure to heavy metals is a silent infection to which we are daily exposed either by labor occupation, drinking contaminated water or inhalation of toxic fumes. Some metals continue to be used even in oncological medical treatment, dental treatment through amalgam and also in diagnostics, such as in imaging.

Occupational diseases are currently an increasingly problematic. In the Tabela Nacional de Incapacidades (TNI) are included, as possible causes of these diseases, three metals: mercury (Hg), lead (Pb) and arsenic (As).

This study aimed to determine qualitatively and semi-quantitatively the presence of heavy metals in hair samples from a target population. For this study was used the scanning electron microscopy coupled with X-ray elemental microanalysis (SEM- XRM), which provides information on the morphology and analyzes qualitatively and semi-quantitatively a given sample. This methodology is a versatile tool for the observation and analysis of micro-structural features. With this technique it is possible to detect, within a mass excess of 0.1-0.3 %, the presence of heavy metals in a sample.

By applying this technique to identify types of metals in different samples, a strong medical-legal importance is acquired.

In this work was observed the presence of heavy metals and rare earths in samples under study, wich may indicate that chronic exposure of this population to heavy metals favors inflammatory processes and corresponding oxidative stress, promoting carcinogenesis.

ÍNDICE

Introdução.....	1
1. Medicina Legal.....	2
1.1 Breve Introdução Histórica.....	2
1.2 Conceitos Médico-Legais.....	4
1.3. Medicina Legal como Disciplina Multidisciplinar.....	5
2. Toxicologia.....	7
2.1. Toxicologia Moderna.....	8
2.2. Toxicologia Forense.....	9
3. Tabela Nacional de Incapacidades (TNI).....	10
4. Metais Pesados	12
5. Cádmio	14
5.1. Origem e exposição do Cádmio	14
5.2. Efeitos na saúde do Homem.....	15
5.3. Stress Oxidativo do Cádmio.....	16
5.4. Carcinogénese do Cádmio.....	17
6. Mercúrio.....	19
6.1. Origem e exposição do Mercúrio	19
6.2. Efeitos na saúde do Homem.....	20
6.3. Carcinogénese do Mercúrio.....	22
7. Chumbo.....	23
7.1. Origem e exposição do Chumbo.....	23
7.2. Efeitos na saúde do Homem.....	24

7.3. Stress Oxidativo do Chumbo.....	25
7.4. Carcinogénese do Chumbo.....	26
8. Arsénio.....	27
8.1. Origem e exposição do Arsénio.....	27
8.2. Efeitos na saúde do Arsénio.....	28
8.3. Stress Oxidativo do Arsénio.....	29
8.4. Carcinogénese do Arsénio.....	30
9. Terras Raras.....	32
9.1. Origem e exposição das Terras Raras.....	32
9.2. Efeitos na saúde das Terras Raras	34
9.3. Carcinogénese das Terras Raras	36
10. Cabelo como amostra biológica de estudo.....	37
11. Stress oxidativo e Carcinogénese dos Metais Pesados.....	39
12. Objetivo.....	44
Materiais e Métodos.....	45
Resultados.....	49
Discussão.....	53
Conclusão.....	57
Perspetivas Futuras.....	59
Bibliografia.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1.1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, onde é visível uma imagem de elétrons secundários ampliada 5000x cuja imagem refere-se a uma amostra de cabelo.....	50
Fig.1.2. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, na versão de elétrons retrodifundidos onde os pontos brilhantes são característicos da presença de um metal pesado.....	50
Fig.1.3. Espectro de Microanálise de Raios-X, que evidência a análise de Z1, onde é possível identificar a presença de Titânio (Ti), Silício (Si) e Alumínio (Al)	50
Fig.2.1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, onde é visível uma imagem de elétrons secundários ampliada 20000x cuja imagem refere-se a uma amostra de cabelo.....	51
Fig.2.2. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, na versão de elétrons retrodifundidos onde os pontos brilhantes são característicos da presença de um metal pesado.....	51
Fig.2.3. Espectro de Microanálise de Raios-X, que evidência a análise de Z3, onde é possível identificar a presença do metal pesado Crômio (Cr) e Ferro (Fe).....	51
Fig.3.1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, onde é visível uma imagem de elétrons secundários ampliada 10000x cuja imagem refere-se a uma amostra de cabelo.....	52
Fig.3.2. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, na versão de elétrons retrodifundidos onde os pontos brilhantes são característicos da presença de terras raras.....	52
Fig.3.3. Espectro de Microanálise de Raios-X, que evidência a análise de Z1, onde é possível identificar a presença de Terras Raras, nomeadamente, Cério (Ce) e Lantânio (La).....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ALAD	Ácido Delta Aminolevulínico Desidratase
ALT	Alanina Aminotransferase
Ap-1	Activator Protein - 1
AST	Aspartato Aminotransferase
CEMUP	Centro de Materiais da Universidade do Porto
EDS	Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios- X
ER	Elétrões Retrodifundidos
ES	Elétrões Secundários
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSR	Glutathione Redutase
GSSG	Glutathione Oxidada
HIF-1	Hypoxia-inducible Factor-1
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgE	Imunoglobulina E
JNK	Proteína Cinase C-Jun N-Terminal
LDH	Lactato Desidrogenase
Lef-1	Lymphoid Enhancer Factor-1
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDA	Malondialdeído
MET	Microscópio Eletrónico de Transmissão

MEV	Microscópio Eletrónico de Varrimento
NAG	N-acetil- β – D – glucosaminidase
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
p38 MAPK	p38 Mitogen-activated Protein Kinases
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
SEM-XRM	Microscopia Eletrónica de Varrimento acoplada à Microanálise de Raios-X
SOD	Superóxido Dismutase
TCF	T Cell Factor
TCF4	T Cell Factor 4
TNI	Tabela Nacional de Incapacidades
U-Cd	Concentração de Cádmio na Urina
Wnt	Wingless-type MMTV Integration site Family

INTRODUÇÃO

1. MEDICINA LEGAL

1.1. Breve Introdução Histórica

Historicamente, a Medicina Legal pode ser dividida em cinco períodos: Antigo, Romano, Médio, Canônico e Moderno ou Científico [1].

Período Antigo

Durante o período Antigo a medicina era considerada uma profissão subalterna e vista mais como uma arte do que uma ciência. Os cadáveres eram considerados sagrados, e por esta razão era proibida a realização de necrópsias. No Egito, os crimes sexuais eram condenados, caso o indivíduo apresenta-se ereção enquanto virgens nuas ou com roupas transparentes dançavam. Em 1240 a.C., na China, foi criado um valioso documento médico-legal, o tratado *Hsi yuan lu*, que falava acerca do exame *post-mortem*, listava antídotos para venenos e continha informações acerca da respiração artificial. Devido ao Cristianismo, neste período, deu-se a emancipação do Direito [1].

Período Romano

Anteriormente à reforma de Justiniano, em Roma, Numa Pompílio criou uma lei que determinava a histerotomia quando uma mulher grávida falecia. Nesta época os cadáveres já eram examinados externamente por médicos. Existem relatos na bibliografia que referem que o médico Tito Lívio examinou em praça pública os cadáveres de Tarquínio (assassinado) e de Germânico (suspeito de envenenamento). Com a reforma de Roma, a Medicina e o Direito afirmaram-se. Na Grécia antiga o interesse pela Medicina também aumentou. Entre 460-377 a.C., Hipócrates mencionou algumas noções sobre anatomia e fisiologia e entre 131-210 d.C., Galeno realizou experiências com animais e examinou os seus cadáveres [1].

Neste período realizou-se uma das primeiras autópsias com interesse forense, por volta do ano 44 a.C., o médico Antístius autopsiou o corpo de Júlio César para determinar qual das 23 facadas provocou a sua morte [2].

Período Médio

Foi durante este período (1248) que surgiu o livro chinês, *Hsi Duam Yu* (“A abolição de um erro”) umas das primeiras referências literárias forense. Este livro descreve diferentes marcas e ferimentos que poderiam auxiliar a distinguir entre estrangulamento e afogamento, e ajudar a distinguir se uma morte era acidental ou intencional [2].

Também neste período, foram fundadas as bases da patologia moderna pelos cirurgiões italianos, Fortunato Fidelis e Paolo Zacchia. Na Europa, durante a guerra, vários cirurgiões de exércitos, tal como o francês Ambroise Paré e o espanhol Juan Fragoso, recolheram dados importantes acerca da morte violenta provocada pelos ferimentos sofridos na guerra [3].

Diz-se que a Idade Média foi a “escuridão do pensamento humano”, visto que a proibição da dissecação dos cadáveres impediu o desenvolvimento da Medicina [1].

Período Canónico

Durante 1200 a 1600 deu-se o período Canónico. Este período foi dominado pelo Cristianismo, que através da codificação das Decretais dos Pontífices dos Concílios dá normas ao Direito Moderno dos povos civilizados. Em 1537, ocorreu a promulgação do Código Criminal Carolino (de Carlos V), acontecimento que marca este período. Este código é o primeiro documento organizado de Medicina Judiciária e afirma que devem ser realizadas perícias médicas antes dos juízes tomarem decisões [1].

Ambroise Paré escreve o primeiro livro de Medicina Legal, em 1575, intitulado *Des rapports et des moyens d'embaumer les corps morts* [1].

Período Moderno ou Científico

Neste período a investigação dedica-se fundamentalmente a fenómenos naturalísticos, químicos, físicos e psíquicos relacionados com condutas criminosas. Com o desenvolvimento das várias ciências surge uma nova, a criminologia [2].

Em Itália, Fortunato Fidelis publica em 1602 o livro *De Relatoribus Libri Quator in Quibus e a Omnia quae in Forensibus ac Publicis Causis Medici Preferre Solent Plenissime Traduntur*, que dá início a este período [1].

Paulus Zacchias é considerado por muitos autores o fundador da Medicina Legal, visto que em 1621 publica o livro *Quaestiones Medico Legales Opus Jurisperitis Maxime Necessarium Medicis Peritilis*, obra que estuda diversos problemas médico-legais [1].

No século XIX devido a vários nomes como o de Orfila, Divergie, Lacassagne, Rollet, Thoinot, Tardieu e Brouardell, na França; Bernt, Hoffman, Schanesteir e Paltauf, em Viena; Telchmeyer, na Alemanha; Hunter e Cooper, na Inglaterra; Barzelloti, Martini, Perrone, Garófolo, Virgílio, Nicéforo, Falconi e Ferri, na Itália; Balk, Gromev, Schmidt e Poelchan, Dragendorff e Pirogoff, na Rússia; a disciplina de Medicina Legal progrediu. Neste século com a construção de novos aparelhos e descobertas de novas técnicas a Medicina Legal ganha autonomia como ciência [1].

1.2. Conceitos Médico-Legais

A Medicina Legal é o conjunto de conhecimentos médico-psico-biológicos aplicados às diversas áreas de atuação do direito (direito civil, direito penal, direito do trabalho, direito administrativo, entre outros), ou seja, está intimamente relacionada com as ciências jurídicas e sociais [4].

Esta pode ser designada de Medicina Judicial ou Medicina Forense. A Medicina Legal surge juntamente com as questões e exigências da Justiça, e dedica-se aos problemas médicos que interessam à saúde dos Homens que se reúnem em sociedade. Esta área tem repercussões a nível legal, cível e político [3].

Atualmente, a Medicina Legal está inserida no âmbito da medicina social, visto que esta contribui para a promoção da saúde das populações [5].

Esta ciência encontra-se constantemente em expansão, o que leva a necessidade de uma adaptação dos seus métodos às novas tecnologias, às descobertas científicas, e às mudanças sociais e do direito [6].

Compete à Medicina Legal a realização de autópsias médico-legais quando há suspeita de morte violenta, causa ignorada, casos de intoxicação, acidentes de trabalho, acidentes de viação e aviação, e sempre que seja necessária a confirmação de um diagnóstico. É também sua competência estudar e opinar sobre determinada terapêutica, como por exemplo em casos de responsabilidade médica. Para elaborar hipóteses e conclusões durante as suas pesquisas a Medicina Legal utiliza frequentemente outras ciências, como a Química e a Física [4].

Esta área através da perícia contribui para a prevenção e reabilitação/reintegração/reinserção [6].

A Medicina Legal tem como principal objetivo auxiliar o direito na aplicação da justiça, através da prestação de serviços [6].

1.3. Medicina Legal como Disciplina Multidisciplinar

Existem várias áreas de atuação da Medicina Legal, designadamente, a medicina forense (inclui a tanatologia forense, clínica médico-legal e psiquiatria forense) e outras ciências forenses (inclui a toxicologia forense, genética e biologia forense, anatomia-patológica forense, psicologia forense, criminalística, antropologia forense e odontologia forense, etc.) [6].

Em Portugal o serviço nacional de Medicina Legal organiza-se em torno do Instituto de Medicina Legal. Existem diferentes delegações (Coimbra, Lisboa e Porto) e gabinetes médico-legais, onde é desenvolvida a atividade pericial. Os gabinetes médico-legais apenas realizam atividades periciais no âmbito da Clínica médico-legal e da Tanatologia Forense. No caso das delegações, estas abrangem vários serviços, tais como [6]:

O serviço de Tanatologia Forense, ao qual compete a realização de autópsias médico-legais e a realização de outros atos neste domínio, designadamente, identificação de cadáveres e restos humanos, estudo de peças anatómicas e embalsamamento.

O serviço de Clínica médico-legal, ao qual compete a realização de perícias e exames em pessoas nos diversos domínios do direito (penal, civil e do trabalho), para a descrição e avaliação dos danos provocados na integridade psico-física.

O serviço de Psiquiatria Forense, ao qual compete a realização de perícias e exames psicológicos e psiquiátricos solicitados à delegação.

O serviço de Genética e Biologia Forense, ao qual compete a realização de perícias e exames laboratoriais, de hematologia forense e de outros vestígios orgânicos, tais como os exames de criminalística biológica, investigação biológica de filiação, entre outros.

O serviço de Anatomia Patológica Forense, ao qual compete a realização de perícias e exames de anatomia patológica forense.

Introdução

O serviço de Toxicologia Forense, ao qual compete a realização de perícias e exames laboratoriais toxicológicos e químicos, que se desenvolverá mais aprofundadamente de seguida.

2. TOXICOLOGIA

A toxicologia (do grego *toxikon* - veneno das flechas) é a ciência que estuda os xenobióticos e/ou endobióticos, os seus mecanismos de ação e os efeitos tóxicos que estes provocam. Esta ciência tem como principal objetivo a identificação e quantificação dos efeitos adversos associados com a exposição a determinados agentes, que possuem a designação de tóxicos [7].

Um tóxico/veneno é qualquer composto químico com capacidade de produzir efeitos nocivos ou mesmo a morte de um sistema biológico, visto que alteram elementos bioquímicos essenciais para a vida [3].

Os tóxicos são normalmente substâncias químicas de origem orgânica ou inorgânica que podem associar-se a alguns agentes físicos ou a outras condições. O estudo destes compostos e das suas intoxicações permite estabelecer um limite de segurança, para que os meios biológicos possam interagir com os mesmos [7].

Os tóxicos podem ser classificados segundo vários critérios. Em toxicologia Clínica existem 7 grupos de tóxicos. Esses grupos dividem-se em gases, substâncias orgânicas termolábeis, substâncias voláteis, metais ou metalóides, pesticidas, aniões, e outras substâncias mais específicas [7].

A evolução histórica da toxicologia pode ser dividida em várias fases. Inicialmente o Homem descobriu os tóxicos existentes na natureza com a descoberta de animais e plantas tóxicas. A primeira aplicação da toxicologia ocorreu quando os tóxicos foram utilizados como arma de caça.

Os Índios e os Egípcios deixaram referências e algumas marcas da utilização de tóxicos e também dos seus antídotos [8]. Na civilização Grega os venenos eram utilizados como arma de execuções em suicídios e homicídios. Um exemplo dessa situação é a famosa morte de Sócrates em 339 a.C., descrita por Platão, que morreu envenenado por um extrato de cicuta [9]. Em Roma, oito anos depois, ocorreu uma intoxicação em massa [3].

Durante a Idade Média existiam diversos envenenadores profissionais que ofereciam os seus serviços aos mais poderosos. Este uso abusivo dos venenos levou a que fosse criada a lei de Lucio Cornélio, que através do envenenamento castigava os crimes com morte [9].

A cicuta, o acónito, o ópio, a beladona, o arsénio e os corrosivos eram os venenos mais utilizados na altura [8].

Até ao séc. IX acreditava-se que um corpo negro, azul, pontilhado ou com odor desagradável indicava que a sua morte seria causada por envenenamento. Outro dos mitos passava por queimar os corações humanos e, caso estes não ardessem, indicava a presença de veneno. Também nessa altura acreditava-se que um cadáver não sofreria decomposição quando a causa de morte de um indivíduo fosse envenenamento [8].

No séc. XIV, Paracelsus citou a célebre frase “Todas as substâncias são venenos, não existe uma que não seja veneno. Somente a dose certa diferencia um veneno de um remédio”.

No séc. XVIII, o físico alemão Hermann Boerhaave foi o primeiro a desenvolver um método químico que determinasse a presença de um tóxico [8]. Durante este mesmo século, o veneno deixou de ser usado como arma apenas pelos mais nobres, e passou a ser utilizado por todas as classes sociais [9].

Mathieu Orfila, o “pai da toxicologia”, em 1814, publicou a primeira abordagem ao estudo da natureza química e fisiológica dos tóxicos, o *Tratado dos Venenos* [8]. Em 1828, fez a disciplina académica com o lançamento da sua obra *Traité des poisons tires mineral, vegetal et animal ou toxicologie general sous les rapports de la pathologie et la Médecine Légale* [9].

Foi durante a Segunda Guerra Mundial que se tornaram mais conhecidos os mecanismos de toxicidade das substâncias. Após a Segunda Guerra Mundial surge a Toxicologia Moderna.

2.1. Toxicologia Moderna

A Toxicologia Moderna difere da toxicologia tradicional por expandir de uma forma significativa o seu campo de ação e a sua zona de interesses. Nesta área, é muito importante o conhecimento da fisiopatologia, visto que permitirá realizar um melhor diagnóstico e um tratamento adequado [3].

A Toxicologia Moderna é constituída por quatro áreas principais: clínica, forense, reguladora e de investigação. Consoante a área de atividade podem ser subdivididas em Ecotoxicologia, Toxicologia Alimentar, Toxicologia Clínica, Toxicologia Experimental,

Toxicologia Forense, Toxicologia Industrial, Toxicologia dos Medicamentos, Toxicologia Ocupacional e Toxicologia Regulamentadora [7].

2.2. Toxicologia Forense

Uma das áreas da Medicina Legal é a Toxicologia Forense. Esta área está inserida no âmbito da toxicologia analítica. O principal objetivo da Toxicologia Forense é a detecção e quantificação de substâncias tóxicas [7].

Atualmente a população está em constante perigo pois tem à sua disposição vários venenos e toxinas. É por isso, importante reconhecer, identificar e quantificar o risco relativo da exposição humana a agentes tóxicos. Assim, a Toxicologia Forense utiliza conhecimentos de todas as áreas da Toxicologia Moderna [7].

Esta área da Medicina Legal dedica-se ao estudo de casos de dependência de substâncias de abuso, alimentos contaminados por substâncias tóxicas, doping, gases letais (designadamente o monóxido de carbono), venenos, entre outras questões importantes relacionadas com a área [4].

As intoxicações podem ser criminais, legais (pena de morte), acidentais (alimentares, mordedura de animais, medicamentosas) ou voluntárias (toxicodependência) [7].

Segundo a velocidade de desencadeamento de ações ou efeitos dos tóxicos, as intoxicações podem ser agudas, sub-agudas e crônicas [7].

3. TABELA NACIONAL DE INCAPACIDADES (TNI)

No âmbito do contexto médico-legal e pelo Decreto-lei nº 341/93 de 30 de Setembro, foi legislada, pela primeira vez em Portugal, a Tabela Nacional de Incapacidades. Esta tem como objetivo fornecer bases do prejuízo funcional sofrido em consequência de acidente de trabalho e doença profissional, com perda de capacidade de ganho. A cada situação de prejuízo funcional corresponde um coeficiente expresso em percentagem, que traduz a proporção da perda da capacidade de trabalho resultante da disfunção, como sequela final da lesão inicial, sendo a disfunção total, com incapacidade permanente absoluta para todo e qualquer trabalho [10]. Revogando o anterior Decreto-lei (Decreto-lei nº 341/93 de 30 de Setembro) é aprovada uma nova TNI para acidentes de trabalho e doenças profissionais, de acordo com o Decreto-lei nº 352/2007 de 23 de Outubro. Esta nova TNI consiste em duas tabelas de avaliação de incapacidades, (i) destinada a proteger os trabalhadores no domínio particular da sua atividade no âmbito do direito laboral (Tabela Nacional de Incapacidades por Acidentes de Trabalho e Doenças Profissionais, revista e atualizada), (ii) direcionada para a reparação do dano em direito civil (Tabela Nacional para a Avaliação de Incapacidades Permanentes em Direito Civil). Este Decreto-lei (Decreto-Lei n.º 352/2007, DR n.º 204, Série I de 2007-10-23) surgiu com o objetivo de impedir o uso inadequado da TNI e contribuí para uma melhor avaliação da incapacidade, considerando o sinistrado num todo físico e psíquico, deixando de o considerar apenas pela função exercida [1].

Na TNI estão contemplados três metais, o mercúrio (Hg), o chumbo (Pb) e o arsénio (As), como possíveis causadores de doenças profissionais.

Entende-se como doença profissional, aquela que resulta diretamente das condições do trabalho e que consta da lista de doenças profissionais, causando incapacidade para o exercício da atividade ou morte. As doenças profissionais encontram-se descritas no Decreto regulamentar nº 76/2007 de Junho. Consideram-se ainda todas aquelas que o doente prove serem consequência da atividade exercida, e não resultem de fatores normais de desgaste do organismo.

No âmbito do Decreto – Lei nº 162/2009 de 21 de Agosto as emissões gasosas gerais de mercúrio não devem ultrapassar os $0,2\text{mg/N m}^3$ [1].

No caso do chumbo, o Decreto – Lei nº 274/89 de 21 de Agosto indica que o valor da concentração de chumbo no ar no local de trabalho não deve ultrapassar os $150\mu\text{g/m}^3$, referido a oito horas diárias e 40 horas por semana. A concentração de chumbo no sangue está fixada em $70\mu\text{g}$ de chumbo por 100 ml de sangue [1].

O valor alvo para o arsénio é de $60\mu\text{g}/\text{m}^3$ para o teor total da fração PM_{10} (partículas suscetíveis de passar através de uma tomada de amostra seletiva, com 50 % de eficiência para um diâmetro aerodinâmico de $10\mu\text{m}$), calculada como média durante um ano civil. Existem limiares de avaliação da concentração de arsénio no ar ambiente numa zona ou aglomerado, nomeadamente, o limiar superior de avaliação em percentagem do valor-alvo é de 60 % ($3,6\mu\text{g}/\text{m}^3$) e o limiar inferior de avaliação em percentagem do valor-alvo é de 40 % ($2,4\mu\text{g}/\text{m}^3$) [1].

4. METAIS PESADOS

Os metais pesados são contaminantes ambientais com propriedades tóxicas e ecotóxicas para os seres humanos e para a vida selvagem [11, 12].

Há mais de 5000 anos que o Homem encontra-se exposto a metais pesados, desde que iniciou a sua extração e processamento. Ao longo de vários anos, os metais pesados foram utilizados em diversas atividades do quotidiano dos seres humanos [13].

Com o aumento progressivo da poluição proveniente da industrialização, atualmente, a população encontra-se exposta a estes agentes químicos [11]. Para além da industrialização, existem outras formas de exposição aos metais, como por exemplo, os produtos de contraste utilizados nas ressonâncias magnéticas, onde se utiliza o sulfato de bário e o gadolínio para efetuar o contraste.

Por esta razão, a população em geral é diariamente exposta a estes poluentes através de diversas vias, incluindo, a inalação de ar contaminado, consumo de água potável contaminada, exposição a solos contaminados, resíduos industriais, e consumo de alimentos contaminados [11].

De acordo com Duffus *et al.*, não há nenhuma definição relevante de metais pesados na literatura. Contudo, estes são tradicionalmente definidos com base na sua densidade [12].

Os metais pesados são elementos químicos que possuem uma gravidade específica. Essa gravidade é pelo menos cinco vezes a gravidade específica da água. Deste modo, os metais pesados podem ser definidos como compostos químicos que têm uma densidade específica de mais de 5 g/cm³ [13].

Em pequenas quantidades, alguns metais pesados são nutrientes essenciais para uma vida saudável. Alguns exemplos desses elementos essenciais são o ferro, cobre, cobalto e zinco. O ferro é essencial para o funcionamento da maioria das células, uma vez que é necessário em vários processos metabólicos básicos, nomeadamente, transporte de oxigénio, síntese de DNA, funcionamento de certas enzimas e transporte de eletrões. Existem também alguns processos bioquímicos que dependem do cobre, tais como, a produção de energia durante a respiração, a síntese de proteínas estruturais (ex. colagénio e elastina) e a síntese do neurotransmissor noradrenalina, entre outros.

Estes elementos encontram-se naturalmente presentes em alguns alimentos específicos (designadamente nos frutos do mar, frutas e legumes) [11].

O arsénio, berílio, cádmio, crómio, chumbo, manganês, mercúrio, níquel e selénio são denominados de metais pesados devido à sua elevada massa atómica. Estes compostos existem na natureza e mesmo em baixas concentrações, podem influenciar de forma irreversível os processos fisiológicos e bioquímicos, podendo causar lesões ou morte em animais, plantas e seres humanos [13].

O chumbo, cádmio, mercúrio e arsénio são os metais pesados que constituem as principais ameaças para a saúde humana (o arsénio é um metalóide, mas usualmente é classificado como um metal pesado) [13].

Os metais pesados prejudicam a saúde humana, pois podem provocar *stress* oxidativo celular (Cd, Cr, Pb e As), lesões neurológicas (Pb e Hg), lesões ao nível do DNA (As, Cr e Cb), alterações no metabolismo da glicose (As) ou do cálcio (Cd e Pb), e podem interferir com alguns elementos essenciais (Cd e Hg) [11].

Segundo alguns estudos epidemiológicos acerca da exposição ambiental e ocupacional aos metais, a exposição aos mesmos está relacionada com o aparecimento de várias doenças a nível do sistema pulmonar, imunológico, neurológico, renal, endócrino, cardiovascular e reprodutor [11, 14].

Um dos fatores mais importantes na retenção de um metal no organismo é a sua semi-vida biológica. Entende-se por semi-vida biológica o tempo que o organismo demora a excretar metade da quantidade tóxica acumulada. O tempo de semi-vida pode variar de metal para metal, e depende do órgão/tecido ao qual o metal se associou. Por exemplo, nos rins a semi-vida biológica do cádmio é cerca de 20 a 30 anos, por outro lado metais como o arsénio ou o lítio têm uma semi-vida de apenas algumas horas ou poucos dias [8].

São vários os metais pesados referenciados na bibliografia indexada como potenciais agentes carcinogénicos. A exposição crónica a estes compostos potencia processos de inflamação crónica que consequentemente induzem *stress* oxidativo e carcinogénese. Far-se-á, de seguida, referência, de uma forma desenvolvida, do Cádmio, Mercúrio, Chumbo e Arsénio, visto que estes metais têm um grande impacto ambiental e são emitidos para o ambiente através de variadas fontes colocando em risco a saúde do Homem, através de um fenómeno de “poluição silenciosa”.

5. CÁDMIO

5.1. Origem e exposição do Cádmio

O cádmio (Cd) é um metal de transição tóxico, que tanto pode ser considerado um agente tóxico ocupacional como ambiental [15]. Este metal existe naturalmente em minérios constituídos por zinco, chumbo e cobre.

Em meados do século XIX o cádmio foi amplamente utilizado em pigmentos de tinta pelo famoso pintor Claude Monet, mas a escassez deste metal limitou o seu uso durante essa época [13].

Os compostos do cádmio, atualmente, são utilizados em baterias recarregáveis de níquel-cádmio. Ao longo do século XX as emissões destes compostos para o meio ambiente têm aumentado significativamente, uma das principais razões é o facto dos produtos deste metal, raramente, serem reciclados [13].

O tabagismo é a principal fonte de exposição a este metal. Indivíduos que fumam têm uma concentração de cádmio no sangue cerca de 4 a 5 vezes maior do que indivíduos não fumadores [13, 16].

Em indivíduos não fumadores, a alimentação é a principal fonte de exposição a este metal, uma vez que o cádmio é utilizado em fertilizantes para terras agrícolas, levando à contaminação dos solos e absorção deste metal pelas plantas e legumes que serão mais tarde consumíveis pelo Homem. O rápido processo de absorção de cádmio pelas plantas e legumes deve-se ao baixo pH que este apresenta. As concentrações de cádmio variam consideravelmente de alimento para alimento e de indivíduo para indivíduo devido às diferenças de hábitos alimentares entre as populações [13, 16].

Normalmente, as mulheres ingerem menos doses diárias de cádmio do que os homens, uma vez que elas consomem menos energia que eles [13].

A concentração de cádmio na urina (U-Cd) é influenciada fundamentalmente pelo peso corporal de cada indivíduo. Normalmente, U-Cd é proporcional à concentração existente no rim [13]. Indivíduos fumadores e indivíduos que vivem em áreas contaminadas apresentam uma concentração de cádmio na urina superior àqueles que não se encontram nessas condições. Por exemplo, indivíduos fumadores possuem U-Cd duas vezes mais alta que indivíduos não fumadores [16].

O elevado tempo de semi-vida deste metal e a sua lenta excreção fazem do cádmio uma toxina que se encontra acumulada no nosso organismo durante um longo período de tempo [15].

5.2. Efeitos na saúde do Homem

As principais vias de absorção do cádmio são os pulmões, intestinos e pele [17]. A inalação de fumos ou partículas de cádmio podem ser fatais, embora sejam esporádicos os casos em que isso acontece. Frequentemente ocorrem problemas pulmonares agudos que posteriormente podem originar a morte [18].

No organismo este metal encontra-se fundamentalmente ligado a metaloenzimas. O complexo cádmio – metaloenzimas encontra-se distribuído por vários tecidos e órgãos onde por fim é reabsorvido nos túbulos renais [17].

O cádmio acumula-se no organismo devido á inexistência de mecanismos de excreção para este metal. No córtex renal o seu tempo de semi-vida é cerca de 20 a 35 anos. No Homem, o cádmio encontra-se depositado em maiores concentrações no rim, fígado, pâncreas e pulmões [17].

A exposição a este metal pode causar lesões ao nível dos rins. Normalmente, uma disfunção tubular é o primeiro sinal de lesão renal. Nestes casos ocorre um aumento significativo da excreção de proteínas de baixo peso molecular, tais como a β 2-microglobulina e α 1-microglobulina (proteína HC) ou enzimas, tais como a N-acetil- β – D – glucosaminidase (NAG). Alguns estudos sugerem que as lesões tubulares são reversíveis, mas existem evidências de que quando se trata do cádmio este induz lesões tubulares irreversíveis [16].

As lesões tubulares iniciais podem progredir para lesões mais graves nos rins. Alguns estudos revelam que trabalhadores expostos ao cádmio desenvolveram uma diminuição da taxa de filtração glomerular [13]. Estes indivíduos têm uma maior probabilidade de vir a desenvolver cálculos renais (pedra nos rins), isto deve-se ao aumento da excreção de cálcio pela urina, consequência das lesões tubulares [16].

A exposição ao cádmio pode estar também, associada à insuficiência renal crónica [13].

Alguns estudos afirmam que um indivíduo que se encontre exposto a baixas concentrações de cádmio pode vir a desenvolver doenças ósseas, tais como osteoporose e fraturas [13].

Por estas razões, devem ser tomadas medidas para reduzir a exposição das populações a este metal, de forma a minimizar os riscos dos efeitos adversos para a saúde [13].

5.3. Stress Oxidativo do Cádmio

O cádmio, por si só, é incapaz de formar radicais livres de forma direta, contudo, segundo Jomova *et al.*, este pode formar indiretamente ROS (*reactive oxygen species*) e RNS (*reactive nitrogen species*), envolvendo os radicais superóxido, hidroxilo e o óxido nítrico [17].

Como já foi referido, o cádmio pode produzir de maneira indireta a formação de radicais livres, isto ocorre porque este metal substitui o ferro e o cobre por várias proteínas de membrana e citoplasmáticas (por exemplo, a ferritina e a apoferritina), aumentando assim a quantidade de cobre e iões de ferro que participam no *stress* oxidativo através de reações de Fenton [17, 19].

O aumento da toxicidade induzida pelo cádmio pode ser explicado pelo deslocamento do cobre e ferro. O cobre, deslocado do seu local de ligação é capaz de catalisar a repartição de peróxido de hidrogénio através da reação de Fenton [17].

Este metal é capaz de induzir *stress* oxidativo, uma vez que inibe enzimas antioxidantes, como por exemplo, catalase, glutathione-peroxidase (GPx), glutathione-redutase (GSR) e superóxido dismutase (SOD), através da interação com os grupos tiol [19].

O cádmio pode ativar também proteínas cinases C que provocam a fosforilação de vários fatores de transição, que por sua vez levam à ativação da expressão do gene alvo [17].

Apesar dos mecanismos tóxicos do cádmio não se encontrarem bem esclarecidos, sabe-se que este atua intracelularmente e provoca lesões através da formação de radicais livres. Estas lesões afetam principalmente os pulmões, rins, ossos, coração, sistema nervoso central e órgãos reprodutores [17].

Alguns marcadores de *stress* oxidativo em tecido cardíaco de ratos expostos ao cádmio demonstraram um aumento significativo de lipoperóxidos e, em simultâneo, uma diminuição da atividade das enzimas SOD e GPx. A nível da atividade da catalase não foram observadas alterações. Observou-se também uma diminuição dos níveis de glucose e um aumento de lípidos no tecido cardíaco. As atividades da alanina aminotransferase (ALT) e do aspartato aminotransferase (AST) diminuíram, isto reflete-se numa diminuição da degradação da proteína metabólica e um aumento da atividade do lactato desidrogenase (LDH). A exposição ao cádmio altera as vias metabólicas referidas anteriormente. Em particular, a formação de Cd^{2+} induzida através de ROS provoca alterações nas vias metabólicas do coração [17].

O testículo é um bom marcador de exposição ao cádmio, visto que este metal provoca lesões e necrose testicular. Têm sido realizados alguns estudos em modelos de ratos para avaliar a toxicidade testicular induzida por este metal. Nestes estudos foi possível observar um aumento de malondialdeído (MDA) e GPx, tal como uma diminuição da atividade da enzima SOD nos grupos expostos. Verificou-se também um aumento do número de células com quebras na cadeia simples de DNA e lesões celulares [17].

5.4. Carcinogénese do Cádmio

O cádmio foi designado carcinogénico humano (grupo I) pela Agência Internacional de Pesquisa de cancro e pelo Programa Nacional de Toxicologia [15, 20].

Vários estudos epidemiológicos têm relacionado a exposição ao cádmio com o desenvolvimento de cancro do pulmão, próstata, rins e pâncreas. De facto, em indivíduos fumadores a probabilidade de virem a desenvolver cancro, quando expostos a este metal, aumenta [17]. Atualmente, estudos revelam que o efeito mutagénico direto do cádmio é fraco, no entanto é suficiente para induzir tumores se combinado com outros efeitos pró-cancerígenos deste metal, tais como; formação de ROS, interferência com enzimas antioxidantes, inibição de enzimas de reparo de DNA, desregulação da proliferação celular, interferência com os mecanismos pró e anti-apoptóticos e rutura da adesão celular [21].

Sabe-se ainda, que o cádmio (Cd^{2+}) pode causar cancro renal através da interrupção do complexo E-caderina/ β -catenina. Outro fator que contribui para o seu efeito carcinogénico é a desregulação da adesão da E-caderina e alterações ao nível da sinalização Wnt (*wingless-type MMTV integration site family*) / β -catenina [21].

A Wnt é uma cascata de sinalização canónica que é segregada para ativar processos de sinalização de controlo da proliferação celular. Em situações normais, controla o comportamento celular ao promover a ligação ao DNA de proteínas ativadoras da transcrição pertencentes às famílias TCF (*T cell factor*) e Lef-1 (*lymphoid enhancer factor-1*). As proteínas Wnt induzem a estabilização da β -catenina citosólica que se liga ao TCF/Lef-1 no núcleo, ativando a expressão de genes alvo específicos. A proteína β -catenina tem duas funções, primeiro como uma molécula de sinalização da via Wnt, e segundo como uma proteína estrutural em junções aderentes. As caderinas são glicoproteínas dependentes do Ca^{2+} responsáveis pela adesão de algumas células do nosso organismo. A rutura da adesão da E-caderina em tecidos normais, provoca paragem do crescimento e morte celular [21].

Um acontecimento precoce relacionado com a nefrotoxicidade de iões de cádmio (Cd^{2+}) é a alteração das propriedades das junções apertadas e junções aderentes. Isto ocorre, muito provavelmente, devido ao deslocamento de Ca^{2+} que interrompe a interação homofílica da E-caderina. Estes acontecimentos provocam a perda de integridade da adesão célula-célula, a diminuição da resistência transepitelial e um aumento da permeabilidade celular [21].

Assim, a rutura da adesão célula-célula induzida pelo cádmio pode desempenhar um papel muito importante na formação de um tumor [17].

Segundo Chakraborty *et al.*, o Cd^{2+} ativa a via de sinalização Wnt em células renais e induz a transcrição de genes alvo que são mediados pela via Wnt. Os efeitos do Cd^{2+} dependem da densidade celular e do seu estado de proliferação. A indução da via Wnt pelo Cd^{2+} ocorre, não só através da translocação da β -catenina para o núcleo, mas também através do aumento da expressão do fator de transcrição TCF4 (T Cell Factor 4) [21].

Em suma, o Cd^{2+} pode facilitar a carcinogénese em células renais, através da indução da via de sinalização Wnt que, por sua vez, promove a proliferação e sobrevivência das células pré-neoplásicas [21].

6. MERCÚRIO

6.1. Origem e exposição de Mercúrio

O mercúrio (Hg) é um metal pesado com número atômico 80 e massa atômica 200,59. À temperatura ambiente é líquido e inodoro, contudo pode evaporar e libertar vapores tóxicos a temperaturas mais elevadas. Este metal existe em baixas concentrações na crosta terrestre [20].

O mercúrio pode ser encontrado em diversas formas, tais como, metálico (Hg^0), orgânico (metilmercúrio, etilmercúrio ou fenilmercúrio) e inorgânico, e em diferentes estados de oxidação (0, +1, +2) [22].

Nos tempos mais primórdios, o mercúrio era utilizado pelos Romanos na forma de pomada para aliviar as dores dentárias em crianças. Na Grécia antiga este era utilizado como cosmético para clarear a pele. Mais tarde, a sua principal utilidade era como remédio para o tratamento da sífilis. Os compostos de mercúrio também podem ser utilizados como diuréticos [13].

Atualmente, o mercúrio é utilizado na extração do ouro, amálgamas dentárias, termómetros, barómetros e instrumentos para medir a pressão arterial [20]. A sua vasta aplicação a nível industrial faz com que aumente o risco de exposição ocupacional e acidental [23, 24].

O ser humano encontra-se exposto às duas formas orgânicas do mercúrio, nomeadamente, ao metilmercúrio (CH_3Hg^+), e etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), através do consumo de peixe contaminado, amálgamas dentárias e certas vacinas [23, 25].

Em termos de exposição ocupacional os médicos dentistas são o grupo exposto a maiores concentrações de mercúrio [13].

A exposição ocupacional a este metal ocorre principalmente através da via inalatória. Após a inalação cerca de 70 – 80 % do vapor de mercúrio é retido e absorvido. Apenas uma parte deste metal vai para o trato gastrointestinal e menos de 10 % é absorvido [20].

Em termos de exposição não ocupacional, a população em geral encontra-se exposta a este metal através da alimentação. A exposição ao mercúrio não apresenta riscos significativos para a população, com a exceção de certos grupos que consome uma elevada quantidade de peixe [13]. Os níveis de exposição não ocupacional são geralmente mais baixos que os níveis de exposição ocupacional [20].

A natureza também liberta grandes quantidades de mercúrio através da atividade vulcânica, fogos florestais e fontes termais [25].

O mercúrio é uma substância tóxica ambiental que está correlacionada com a toxicidade no cérebro [15]. Este metal apresenta um elevado risco para o feto, por esta razão as mulheres grávidas devem evitar uma grande ingestão de certos peixes como o tubarão, peixe-espada e o atum, pois estes contêm elevadas concentrações de mercúrio [13].

Os compostos inorgânicos do mercúrio podem ser pesquisados na urina. No caso do metilmercúrio (orgânico) o sangue é a amostra ideal. Para pesquisa de uma exposição a longo prazo, o cabelo é a amostra preferencial, no entanto é necessário ter em conta possíveis contaminações externas [13].

6.2. Efeitos na saúde do Homem

Em baixas concentrações, o mercúrio pode induzir *stress* oxidativo e citotoxicidade celular.

Mercúrio Inorgânico

A maior fonte de exposição ao mercúrio inorgânico são as amálgamas dentárias[1].

Uma exposição aguda ao mercúrio pode provocar lesões graves a nível dos pulmões. No caso de uma intoxicação crónica podem surgir alguns sintomas neuro psicológicos, tais como tremores, agitação, ansiedade, alterações da personalidade, distúrbios do sono e depressão. Estes sintomas são reversíveis após cessação da exposição [13].

O mercúrio metálico é um alergénio que pode causar eczema de contato, e líquen oral (proveniente das amálgamas dentárias). Para além disso pode provocar, também, lesões a nível dos rins [13]

Após uma exposição intensa a vapores de mercúrio metálico podem ocorrer lesões pulmonares. No caso de ingestão de mercúrio pode ocorrer necrose gastrointestinal e nos túbulos renais [20].

O mercúrio inorgânico tem menos capacidade que o metilmercúrio para atravessar a barreira placentária, no entanto acumula-se no líquido amniótico em concentrações mais elevadas [23].

Mercúrio Orgânico

Como já foi referido anteriormente a população em geral encontra-se exposta às duas formas orgânicas do mercúrio, o metilmercúrio e o etilmercúrio.

Através da ação de microrganismos (bactérias metanogénicas) o mercúrio inorgânico pode ser convertido em metilmercúrio e dimetilmercúrio. O metilmercúrio é muito estável e acumula-se na cadeia alimentar aquática através de um fenómeno denominado de bioamplificação. Este fenómeno significa que à medida que os níveis tróficos aumentam a concentração do metal também aumenta [23].

A única fonte de exposição ao metilmercúrio, nos humanos, é o consumo de peixe contaminado [23, 25].

O metilmercúrio é absorvido quase na sua totalidade no trato gastrointestinal e é distribuído pela maior parte dos tecidos. Os compostos de metilmercúrio são excretados na bÍlis e intestino. O restante é biotransformado em compostos inorgânicos e excretado através das fezes. Estes compostos podem passar para o feto através do leite materno, pois também são excretados por esta via [20].

Nos seres humanos os compostos de metilmercúrio têm um intervalo biológico de aproximadamente 2 meses [20].

O metilmercúrio é lipossolúvel e penetra rapidamente o sistema nervoso. O indivíduo inicialmente começa por sentir parestesias e dormência nas mãos e nos pés, de seguida os sintomas desenvolvem para dificuldades de coordenação e auditivas. Em doses elevadas pode levar à morte cerca de 2 a 4 semanas após o início da exposição [13]. O sistema nervoso é o principal alvo do metilmercúrio. Para além disso, os compostos orgânicos podem, também, afetar o sistema imunitário e os rins [1]. Alguns estudos referem que o metilmercúrio pode estar relacionado com algumas doenças cardiovasculares [23]. O sangue e o cabelo são amostras utilizadas para realizar a monitorização da exposição a compostos de metilmercúrio [20].

O etilmercúrio é quimicamente semelhante ao metilmercúrio, e ambos têm efeitos tóxicos para o cérebro. No entanto, existem diferenças entre eles, a metabolização do

etilmercúrio em mercúrio orgânico é mais rápida, e o etilmercúrio é menos potente que o metilmercúrio [25]. Este composto não provoca lesões a nível dos rins e tem um curto tempo de semi-vida no organismo [25].

6.3. Carcinogénese do Mercúrio

O mercúrio e os seus compostos são classificados de cancerígenos humanos, capazes de afetar a saúde humana através da exposição ambiental e ocupacional. Contudo, a capacidade deste metal em provocar carcinogénese e produzir efeitos genotóxicos não se encontra totalmente esclarecida na literatura. Alguns estudos revelam que em testes genotóxicos foram detetadas mutações tanto ao nível cromossómico como ao nível génico. Estas mutações são responsáveis pelo aparecimento de tumores e doenças hereditárias. Estudos laboratoriais efetuados em plantas e animais constataram que o mercúrio tem capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomas e consequente poliploidia. Esta é a ação mais comum a nível genético dos compostos de mercúrio, devido à forte afinidade do mercúrio para os grupos sulfidrilo presentes nas proteínas do fuso. Outros estudos revelam que o mercúrio tem também capacidade para produzir radicais livres, via peroxidação lipídica, em organismos vivos. Existem diversas evidências acerca do efeito deste metal a nível do DNA [25].

Sabe-se, também, que a toxicidade do mercúrio pode produzir um aumento dos níveis de glutathione, sugerindo que esta atue como uma defesa celular importante contra a toxicidade deste metal. Outras substâncias antioxidantes, como por exemplo, o ácido ascórbico, têm também uma função protetora contra este tóxico [19]. Sabe-se também que o selénio (Se), afeta a distribuição do mercúrio reduzindo a sua toxicidade. O selénio possui algumas selenoproteínas que tem funções enzimáticas importantes, e o selénio plasmático juntamente com o mercúrio inorgânico forma um complexo insolúvel que se liga à selenoproteína-P. Esta ligação pensa-se que possa prevenir a absorção/captação do mercúrio pelos rins. A selenoproteína-P aparenta atuar como defesa antioxidante, transporte do selénio, e protetor como quelante natural de metais pesados [26].

7. CHUMBO

7.1. Origem e exposição do Chumbo

O chumbo (Pb) é um metal pesado com número atômico 82. Este possui invulgares propriedades físicas e químicas (baixo ponto de fusão, ductilidade e facilidade de formar ligas) que, aliado à sua fácil extração o torna num dos metais mais usados pelo Homem [17, 27].

As suas primeiras aplicações foram em materiais de construção, pigmentos para vidros de cerâmica, condutas de água, recipientes para cozinhar e armazenar alimentos, tintas e como adoçante na produção de vinho [13].

O chumbo é um metal tóxico para os seres humanos e animais, e pode acumular-se no ambiente (água, solo, poeiras, entre outras) durante um longo período de tempo [17].

Durante os últimos 5 milénios devido ao extenso processamento de minérios de chumbo, foram libertados para o ambiente cerca de 300 milhões de toneladas deste metal [28]. Mais de 50% das emissões de chumbo são provenientes da gasolina. No entanto, nas últimas décadas, nos países desenvolvidos as emissões de chumbo diminuíram significativamente, devido à introdução da gasolina sem chumbo. Consequentemente, os níveis de chumbo de sangue diminuíram na população em geral [13].

As emissões de chumbo para o ambiente estão relacionadas com os transportes rodoviários, o que faz com que este metal se encontre distribuído uniformemente pelo espaço. A população em geral encontra-se exposta a este metal através da alimentação e de poeiras que se encontram no ambiente [13].

Aproximadamente 50% do chumbo inorgânico inalado pode ser absorvido pelos pulmões [13]. No caso das crianças, estas são particularmente sensíveis à exposição a este metal, devido à sua elevada absorção gastrointestinal (40-50%), e pelo facto de possuírem uma barreira hemato-encefálica permeável [13]. Nos adultos a absorção gastrointestinal deste metal é de cerca de 3-10% e o chumbo inorgânico é incapaz de penetrar a barreira hemato-encefálica [17]. Na absorção intestinal, o chumbo compete com o ião cálcio (Ca^{2+}), por esta razão uma deficiência de ferro na alimentação aumenta a absorção de chumbo pelo trato gastrointestinal. O chumbo no organismo liga-se às proteínas dos eritrócitos (90%) e é distribuído pelos tecidos moles e ossos. Os ossos são o principal reservatório deste metal no organismo. A sua eliminação é lenta e ocorre

principalmente através da via urinária [29]. O tempo de semi-vida do chumbo no sangue é cerca de 1 mês e no esqueleto cerca de 20-30 anos [13].

7.2. Efeitos na saúde do Homem

O chumbo é uma substância tóxica que pode provocar doenças a nível do sistema neurológico, hematológico, gastrointestinal, reprodutor, circulatório e imunológico [30].

O quadro clínico de um indivíduo intoxicado com chumbo pode ser dividido em duas categorias, consoante a duração da exposição. Pode ser uma intoxicação aguda que se manifesta com aminoacidúria, glicosúria, hiperfosfatemia, anemia hemolítica (o chumbo diminui o tempo de vida dos eritrócitos e perturba a síntese da hemoglobina), gota e encefalopatia; ou intoxicação crónica que se manifesta com nefrite túbulo intersticial e diminuição da função renal. As intoxicações crónicas por chumbo denominam-se saturnismo [31].

Normalmente, as intoxicações por chumbo podem ser diagnosticadas através de níveis elevados deste metal no sangue. Níveis sanguíneos iguais ou superiores a 10g/dL são considerados tóxicos e podem originar distúrbios neurológicos, deficiências cognitivas, hipertensão, entre outros [17]. O chumbo induz a produção de radicais livres que inativam, em células endoteliais, os mediadores vasodilatadores, tais como o óxido nítrico (NO). Este efeito pode explicar o aparecimento de hipertensão em intoxicações por chumbo [32].

Os sintomas de intoxicações por chumbo são dores de cabeça, tonturas, irritabilidade, perda de memória, dores abdominais, sabor metálico na boca, e vários sintomas relacionados com o sistema nervoso. A encefalopatia provocada por este metal é caracterizada por falta de sono e inquietação. Em casos mais graves de encefalopatia, o indivíduo pode desenvolver psicose aguda e confusão. No caso de crianças expostas ao chumbo, estas podem sofrer distúrbios no comportamento e aprendizagem, e apresentarem dificuldades de concentração. Existem evidências que alguns fatores genéticos e ambientais podem contribuir para o aumento dos efeitos do chumbo no desenvolvimento neurológico das crianças, aumentando assim a sua neurotoxicidade [13].

Sabe-se que a exposição aguda a este metal pode causar nefrotoxicidade, nomeadamente a nível dos túbulos proximais renais. Alguns estudos em ratos, observaram para além de nefrotoxicidade, glicosúria, aminoacidúria, hematúria, *stress*

oxidativo e perda de microvilosidades. O chumbo liga-se a proteínas de baixo peso molecular numa proporção inferior a 1%. Por esta razão, é filtrado livremente no glomérulo e é reabsorvido nas células tubulares proximais através de endocitose. Uma vez dentro das células, o chumbo provoca lesões mitocondriais, desacopla a cadeia respiratória, esgota as reservas de antioxidantes, *stress* oxidativo e apoptose. Alguns estudos demonstraram que o chumbo aumenta os processos pró-inflamatórios através do fator nuclear kappa B (NFkB), que por sua vez dentro do rim ativa o sistema renina angiotensina, que assim ativa os macrófagos, gerando-se um processo inflamatório intersticial no rim [31].

Sabe-se que trabalhadores que se encontrem expostos a este metal têm uma frequência mais elevada de infertilidade, abortos, natimortos, abortos espontâneos e diminuição do líbido [30].

7.3. Stress Oxidativo do Chumbo

Semelhantemente a outros metais o chumbo provoca lesões celulares, uma vez que induz *stress* oxidativo às células. A exposição a este metal provoca alterações nos marcadores de *stress* oxidativo, nomeadamente, catalase, SOD, GPx e GSR [19].

O efeito patogénico deste metal é muito variado, visto que este interrompe a atividade de enzimas, inibe competitivamente a absorção de alguns minerais importantes, liga-se às proteínas com grupos sulfidrílo (interrompe a síntese de proteínas estruturais), altera a homeostase do cálcio e reduz os níveis de reservas antioxidantes sulfidrílo disponíveis no organismo [30]. Os radicais livres induzidos pelo chumbo podem causar lesões através de dois mecanismos diferentes que se encontram relacionados. O primeiro mecanismo diz respeito à formação direta de ROS (oxigénio singleto, peróxido de hidrogénio, radical superóxido e radical hidroxilo). O segundo mecanismo baseia-se na redução direta das reservas antioxidantes. Em todos os sistemas biológicos, quando a produção de ROS aumenta, as reservas antioxidantes esgotam-se [17, 30].

A maioria das intoxicações por chumbo interferem com o metabolismo da glutathione, nomeadamente provocam alterações a nível da glutathione reduzida [17]. Para além de atuar como um antioxidante para eliminar radicais livres, a glutathione é um substrato importante que tem um papel crucial no metabolismo de determinados xenobióticos e toxinas através da conjugação da glutathione no fígado [19].

Os grupos sulfidrilos da glutathione podem também, ligar-se a metais tóxicos, tais como o arsênio e o mercúrio, que têm uma afinidade elevada para estes grupos. Por esta razão, quando um organismo encontra-se exposto ao chumbo, os seus níveis de glutathione diminuem de forma significativa, que pode por sua vez, contribuir para o aumento da toxicidade de outros metais [17].

O chumbo tem capacidade para inibir duas enzimas específicas, nomeadamente, GSR e o ácido delta aminolevulínico desidratase (ALAD) [17]. A GSR é a enzima responsável por converter a glutathione oxidada (GSSG) em glutathione reduzida (GSH), vários estudos mostraram que o chumbo interfere com este ciclo, provocando assim, níveis de GSH diminuídos [17].

Alguns estudos em animais e seres humanos mostraram que existe uma relação entre a exposição a níveis baixos de chumbo e a hipertensão. No entanto, existem alguns fatores, tais como, a ingestão de cálcio, exposição a toxinas ambientais, dieta rica em gordura e ingestão de álcool que devem ser tidos em conta. Contudo, sabe-se que a hipertensão está associada ao aumento dos níveis de *stress* oxidativo, e como o chumbo aumenta esses níveis, poderá estar relacionado com o aparecimento desta doença [17, 33].

O *stress* oxidativo induzido pelo chumbo está também associado a lesões em órgãos específicos, nomeadamente, o fígado, os rins e o tecido cerebral [30].

7.4. Carcinogénese do Chumbo

O chumbo é considerado um possível cancerígeno humano, com base em estudos em animais, no entanto os estudos em humanos são ainda insuficientes. Os locais mais prováveis deste metal poder atuar como carcinogénico são os pulmões, estômago e células da glia [13].

8. ARSÉNIO

8.1. Origem e exposição do Arsénio

O arsénio (As) é um metalóide, mas usualmente é classificado como um metal pesado. Este possui número atómico 33 e encontra-se amplamente distribuído pela Natureza. Este metal é considerado um contaminante ambiental e pode ser encontrado em diferentes locais, tais como no solo, água ou sob a forma de partículas transportadas pelo ar [15].

O arsénio apresenta-se fundamentalmente sob duas formas: orgânica e inorgânica. Este pode ser encontrado em diferentes estados de oxidação, sendo os mais comuns, o +5, +3 e -3. Este elemento pode formar compostos orgânicos e inorgânicos, tanto no ambiente, como no interior do corpo humano. Quando o arsénio conjuga-se com outros elementos, tais como, oxigénio, enxofre e cloro, denomina-se arsénio inorgânico; quando combinado com hidrogénio e carbono, denomina-se arsénio orgânico [17].

O arsénio inorgânico encontra-se em águas minerais utilizadas para consumo em vários países, nomeadamente, Chile, China e Bangladesh, e pode ser tri ou pentavalente. No caso do arsénio orgânico, este também pode ser tri ou pentavalente, no entanto como tem uma melhor absorção e eliminação renal, não é tão tóxico; este encontra-se presente na alimentação humana, principalmente nos peixes (arsenobetaína e arsenocolina) [34].

Como o arsénio e a maior parte dos compostos deste metal são incolores e inodoros, a sua presença nos alimentos, água ou ar, constitui um elevado risco para a saúde humana, visto que dificilmente são detetáveis [17].

Os principais processos industriais que levam à contaminação do ar, água e solo com este metal são a fundição de metais não-ferrosos e a produção de energia a partir de combustíveis fósseis. Outras fontes de contaminação são o uso de pesticidas com arsénio e a utilização de conservantes de madeira [13].

A exposição da população a este metal ocorre principalmente através da ingestão de alimentos e de água potável contaminada [13]. Essa exposição pode ocorrer na forma de arsénio inorgânico, que inclui o arsenito [As(III)] e arsenato [As(V)] [15].

No ar, o arsénio inorgânico mais predominante, é o trióxido de arsénio (As_2O_3), e na água, solo e alimentos, encontram-se uma variedade de arsenatos inorgânicos (AsO_4^{3-}) e arsenitos (AsO_2^-) [17].

A absorção do arsénio por partículas transportadas pelo ar depende da solubilidade e tamanho das mesmas. Os compostos solúveis de arsénio são facilmente absorvidos no trato gastrointestinal. O arsénio inorgânico é amplamente metilado no organismo e os seus metabolitos são excretados na urina [34].

A metilação dos metabolitos no nosso organismo é um processo de destoxificação. Os metabolitos metilados são produzidos *in vivo* por reações de conjugação em que S-adenosilmetionina é o co-factor enzimático envolvido na transferência de grupos metilo [35]. Ainda não se encontram esclarecidas quais as metiltransferases envolvidas neste processo. Os metabolitos metilados do arsénio podem ser monometilados (MMA) pentavalentes ou trivalentes e dimetilados (DMA). Os níveis de S-adenosilmetionina são importantes no metabolismo do arsénio, visto que podem interferir com a metilação do mesmo. Os metabolitos metilados são excretados mais rapidamente que os metabolitos inorgânicos, por este motivo é muito importante que ocorra o processo de destoxificação [36].

O arsénio é tóxico para a maior parte dos órgãos. O arsénio inorgânico é mais tóxico que o arsénio orgânico metilado. No entanto, as formas trivalentes são ainda mais tóxicas, pois reagem com os grupos tiol das proteínas. As formas pentavalentes têm menor toxicidade, no entanto, promovem o desacoplamento da fosforilação oxidativa [17].

A concentração do arsénio e dos seus metabolitos no sangue, urina, cabelos e unhas são utilizados como biomarcadores da exposição a este metal. O cabelo e as unhas são biomarcadores úteis na determinação de uma exposição a longo prazo, no entanto, é necessário evitar a contaminação externa das amostras. No caso de uma exposição recente a urina é o biomarcador mais adequado [34].

8.2. Efeitos na saúde do Homem

A exposição ao arsénio e aos seus compostos tem efeitos adversos para a saúde humana. A sua toxicidade depende das diferentes formas químicas e estados de oxidação. Se este metal for ingerido em grandes quantidades podem surgir sintomas gastrointestinais, perturbações cardiovasculares, alterações do sistema nervoso, e até mesmo a morte. Em casos de sobreviventes de intoxicações por este metal, pode observar-se depressão da medula óssea, hemólise, hepatomegalia, melanose, polineuropatia e encefalopatia [13].

A exposição prolongada ao arsénio está relacionada com o aumento do risco de cancro de pele e de outros tipos de cancro (tal como o cancro do pulmão através da exposição ocupacional por inalação, cancro dos rins, bexiga e fígado) [13, 15].

A exposição ao arsenito inorgânico é a principal responsável pelo aumento do risco de cancro, visto que este é mais tóxico que o arsenato. Isto deve-se ao facto do arsenito se incorporar mais facilmente nas células em comparação com o arsenato. Dentro das células o arsenato pode ser reduzido a arsenito, e pensa-se que a glutatona desempenha um papel fundamental nesta redução [36].

As lesões na pele, tais como, hiperqueratose e alterações da pigmentação são lesões frequentes em casos de exposição crónica ao arsénio [17].

Estudos em trabalhadores de fundições, fabricantes de pesticidas e mineiros expostos ao arsénio através da inalação mostraram que é frequente o desenvolvimento de cancro do pulmão [13].

Algumas avaliações da Organização Mundial da Saúde (OMS) concluíram que a ingestão de água contaminada com arsénio está relacionada com o aparecimento do cancro nos pulmões, rins, bexiga e pele [13].

É frequente o aparecimento de doenças cardiovasculares após a exposição oral e inalação do arsénio. Este metal é, também, um potencial fator de risco para a aterosclerose. À semelhança de outros metais, além de ser tóxico, o arsénio é bioacumulativo [17].

8.3. Stress oxidativo do Arsénio

Durante o metabolismo do arsénio dá-se a formação de radicais livres nas células. A formação desses mesmos radicais livres pode causar lesões e morte celular através da ativação de vias de sinalização oxidativas [37].

A formação de espécies reativas de oxigénio mediada pelo arsénio é um processo que envolve a formação de vários tipos de ROS, tais como, superóxido, oxigénio singlete, radical peróxido, óxido nítrico, peróxido de hidrogénio e radicais peróxido e dimetilarsínico [38]. O mecanismo pelo qual o arsénio forma estas espécies reativas ainda não se encontra completamente esclarecido [17].

O arsénio trivalente inibe várias enzimas celulares, tais como, piruvato desidrogenase através da ligação a grupos sulfidrílo, que resulta numa redução da conversão de piruvato em acetil-CoA [17].

O arsénio também inibe a captação de glicose nas células, a gliconeogénese, a oxidação dos ácidos gordos, a produção de acetil-CoA e a síntese de glutathione (potente antioxidante celular) [17].

Durante o metabolismo deste metal nas células, ocorre a produção de vários tipos de ROS. O *stress* oxidativo está associado ao aparecimento de doenças, tais como o cancro. Além da produção de ROS, pensa-se que as espécies reativas de nitrogénio, provocam lesões oxidativas nos lípidos, proteínas e DNA de células expostas ao arsénio[17].

Alguns estudos recentes revelaram que a toxicidade do arsenito no cérebro se deve ao facto deste formar radicais hidroxilo, prejudiciais para a saúde do Homem [17].

A exposição ao arsénio promove a diminuição dos níveis de GSH. A GSH é um antioxidante que desempenha um importante papel na manutenção do estado redox celular e os seus níveis no organismo são um bom marcador de *stress* oxidativo [17].

Evidências recentes sugerem que o arsénio pode promover a transformação celular por mecanismos baseados na cromatina [15].

8.4. Carcinogénese do Arsénio

O arsénio e os seus compostos são classificados como carcinogénicos do Grupo I pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) [39].

O arsenito é o responsável por este efeito carcinogénico, uma vez que as células absorvem o arsenito a uma taxa mais elevada que o arsenato [15].

Alguns estudos acerca de exposições ambientais ao arsénio mostraram que as suas formas pentavalentes não estão associadas ao risco do aparecimento de cancro no Homem. No entanto, o ácido dimetilarsénico, em doses elevadas, provoca carcinogénese em bexigas de ratos. O mecanismo de ação carcinogénica deste metal envolve citotoxicidade, seguido de proliferação celular regenerativa. A citotoxicidade deve-se à formação de um metabolito reativo, que provoca lesões oxidativas pela ligação aos grupos sulfidrílo [36].

Estudos indicam que as formas metiladas de arsénio são mais perigosas que as formas não metiladas. A nível de indução de carcinogénese, este metal substitui o fosfato inorgânico nas vias de fosforilação oxidativa [19].

O arsénio é das poucas substâncias que tem capacidade para provocar angiossarcoma, isto é uma boa indicação das potencialidades carcinogénicas deste metal [38].

Em baixas concentrações o arsenito pode aumentar a mutagenicidade de outros agentes cancerígenos (por exemplo, raios-UV, raios-X, etc.) e interferir com o sistema de reparo de DNA [36].

Neste trabalho foram identificadas qualitativamente terras raras pelo que se fará uma breve referência das mesmas.

9. TERRAS RARAS

9.1. Origem e exposição de Terras Raras

As terras raras ou lantanídeos (Ln) são metais que fazem parte do grupo II da tabela periódica. Estes têm números atômicos sucessivos do 57 ao 71, sendo: lantânio (La), cério (Ce), praseodímio (Pr), neodímio (Nd), promécio (Pm), samário (Sm), európio (Eu), gadolínio (Gd), térbio (Tb), disprósio (Dy), hólmio (Ho), érbio (Er), túlio (Tm), itérbio (Yb) e lutécio (Lu). As propriedades físico-químicas destes elementos são muito semelhantes, devido à sua configuração eletrônica. O ítrio (Y) e o escândio (Sc) também são considerados terras raras pois possuem características físico-químicas muito semelhantes. As terras raras podem ser divididas em elementos leves e pesados. Os elementos leves (La ao Eu) têm uma massa atômica menor, por outro lado os elementos pesados (Gd ao Lu) têm uma massa atômica maior. As terras raras são então constituídas por 17 elementos semelhantes entre si na química elementar. A designação “terras raras” provém do aspeto terroso dos óxidos destes elementos e não da raridade da sua existência [40].

Vários estudos geológicos têm mostrado que estes elementos existem abundantemente na crosta terrestre, por exemplo, o cobalto é menos comum que o cério, o ítrio é mais abundante que o chumbo e o lutécio é tão comum como a prata e o mercúrio.

As terras raras estão presentes em vários minerais, tais como fluoretos, halogenetos, óxidos, carbonatos, fosfatos e silicatos, com especial incidência em granitos, pegmatitos e rochas metamórficas. Sabe-se que existem cerca de 250 tipos de minerais que possuem terras raras na sua constituição [41].

A utilização das terras raras a nível mundial tem aumentado, devido às suas propriedades espectroscópicas e magnéticas, sendo estas utilizadas nas mais diversas áreas, tais como, indústria, agricultura e medicina.

Por exemplo, o ítrio é utilizado em supercondutores e na tecnologia laser; o cério em conversores catalíticos de carros; o lantânio em lentes de câmaras e telescópios (os compostos que contenham lantânio são também utilizados em iluminação de estúdios e na projeção em cinemas); o neodímio em alto-falantes e em discos rígidos; o praseodímio para criar motores de aviões; o gadolínio em raios – X, sistemas de digitalização de imagens de ressonância magnética e em televisões; o ítrio, térbio e európio são utilizados

na indústria de televisores, em ecrãs de computadores e em outros dispositivos; e o európio no controlo de reatores nucleares [41].

Em diversos países, as terras raras estão também a ser utilizadas na agricultura como fertilizantes, diretamente no solo, na parte aérea das plantas, nas sementes e como solução aquosa com elementos misturados ou individualmente. Por estas razões estes elementos são um potencial perigo para a saúde ambiental e ocupacional [41].

Na medicina, a sua principal aplicação são as sondas espectroscópicas no estudo de biomoléculas e como diagnóstico não invasivo (este serve de agente contraste em imagens de ressonância magnética). Estes elementos são extremamente importantes na área da imunologia, visto que são utilizados para a realização do diagnóstico clínico, entre outras, nomeadamente, como marcadores luminescentes com importância para a investigação de enzimas, anticorpos e células.

Devido ao aumento de aplicações das terras raras, o risco destes elementos incorporarem-se nos seres vivos aumentou consideravelmente. A produção de terras raras têm consequências negativas para os organismos aquáticos, terrestres e para o ser humano, o que pode colocar em risco a saúde pública. Por exemplo, a refinação de uma tonelada de óxido de terras raras pode produzir cerca de 1,4 toneladas de resíduos radioativos.

As principais vias de exposição a terras raras são: inalação de poeiras no local de trabalho, ingestão de géneros alimentícios e contacto com produtos industriais ou agentes medicinais (por via oral, venosa, ou através de feridas de queimaduras) que contenham estes elementos. A principal via de exposição accidental para os humanos, é a inalação de partículas transportadas através do ar que contenham lantanídeos.[42].

A principal via de incorporação destes compostos em trabalhadores expostos é também a via inalatória, através da inalação de aerossóis que contenham estes elementos. Uma vez que os lantanídeos afetam os processos metabólicos do ser humano é importante que sejam seguidos parâmetros de segurança no local de trabalho. Uma ventilação inadequada no local de trabalho, falta de higiene por parte dos trabalhadores, bem como a ausência ou uso inadequado de proteções individuais, tais como máscaras, aumentam a probabilidade de exposição, e o risco do aparecimento de doenças pulmonares [41].

9.2. Efeitos na saúde do Homem

Segundo o sistema de classificação de Hodge-Sterner, as terras raras são consideradas substâncias de baixa toxicidade. A sua toxicidade depende da forma química e da via de exposição. Devido à acumulação de partículas de terras raras, a exposição crónica é mais grave que a exposição aguda [42].

Alguns estudos em ratos mostraram que a ingestão oral de terras raras, não causa efeitos genotóxicos, carcinogénicos e teratogénicos. Por outro lado, quando se trata de aplicação intravenosa, os resultados foram contrários. No entanto são necessários estudos mais aprofundados acerca do seu mecanismo de patogenicidade, visto que não se sabe ao certo as células alvo específicas envolvidas durante estes processos. Por esta razão, alguns dos seus efeitos, tal como a indução de neoplasias, podem ou não ser provocadas exclusivamente pelas terras raras, e tal facto, deve ser tido em consideração [42].

Muitos estudos sugerem que as terras raras têm capacidade para acumularem-se no aparelho respiratório. A exposição ocupacional a poeiras de terras raras são consideradas citotóxicas para o tecido pulmonar, e portanto estão intimamente relacionadas com o aparecimento de enfisema, pneumonia, bronquite e fibrose pulmonar progressiva ou pneumoconiose. O potencial poder patogénico dos lantanídeos inalados depende do tipo e fórmula química dos materiais, dose e duração da exposição. A pneumoconiose provocada por terras raras é uma doença pulmonar de longo prazo que pode surgir devido à exposição do Homem, por exemplo, ao fumo de lâmpadas de arco de carbono. As partículas granulares finas de poeiras que contenham elementos de terras raras (principalmente cério), vão-se acumular no aparelho respiratório, provocando doenças intersticiais, enfisema e obstruções graves, levando a uma diminuição da capacidade de difusão do monóxido de carbono. A deposição destas partículas nos pulmões podem ser detetadas por um longo período de tempo, por exemplo através de raios-X, que normalmente apresentam algumas mudanças visíveis. No entanto, os indivíduos que têm esta patologia não apresentam sintomas. No primeiro caso descrito na literatura acerca de pneumoconiose provocada pela exposição a terras raras, o diagnóstico foi realizado através da lavagem broncoalveolar que continha níveis anormais de La, Ce, Nd, Sm, Tb, Yb e Lu [41, 42].

No caso do fígado, este órgão retém uma considerável quantidade de terras raras que provocam efeitos hepatotóxicos. Alguns estudos demonstraram que após a injeção de terras raras a atividade de enzimas específicas do fígado, nomeadamente, ALT e AST aumentaram, e voltaram à normalidade ao fim de 6-10 dias. Também ocorreu necrose

hepática após a injeção subcutânea e intravenosa. No entanto, a lesão hepática mais evidente após injeção intravenosa é o fígado gordo (acumulação de gordura nas células do fígado). Antes de induzir o fígado gordo, as terras raras aumentam as concentrações plasmáticas dos ácidos gordos livres e diminuem os níveis de colesterol e fosfolípidos. Estes mecanismos ainda não se encontram totalmente compreendidos, mas segundo as propriedades bioquímicas dos lantanídeos, presume-se que estes aumentam a retenção hepática de triglicéridos do plasma, e diminuem a oxidação dos lípidos através das mitocôndrias hepáticas, bem como reduzem a síntese hepática e a secreção de lipoproteínas [42]. Sabe-se que no fígado, o gadolínio inibe seletivamente a secreção através das células de Kupffer, e diminui a atividade do citocromo P450 nos hepatócitos, protegendo assim as células hepáticas dos produtos tóxicos resultantes da biotransformação dos xenobióticos. O íon praseodímio (Pr^{3+}) é semelhante ao gadolínio pois também protege os tecidos do fígado [41].

Os lantanídeos também provocam efeitos a nível da estrutura óssea, estes podem associar-se tanto à parte orgânica como à parte inorgânica do osso [42]. A longo prazo, um consumo de doses baixas de terras raras pode levar, a que estas substâncias se acumulem na estrutura óssea, provocando alterações a nível do tecido ósseo, aumento da taxa de micronúcleos, bem como genotoxicidade das células da medula óssea [41].

Swanson e Truesdale (1971) descobriram que lentes humanas com cataratas contêm uma concentração mais elevada de lantânio em comparação com lentes saudáveis. Por conseguinte, pensa-se que os lantanídeos desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença de cataratas [42].

Os lantanídeos exercem diversas ações sobre a maior parte das células nervosas. Contudo, estes elementos são incapazes de penetrar o sistema nervoso central, visto que não atravessam a barreira hematoencefálica [42].

Sabe-se que os íons lantanídeos, em específico, La^{3+} e Gd^{3+} , bloqueiam diferentes canais de cálcio de células humanas e animais. Os íons Dy^{3+} e La^{3+} bloqueiam as transportadoras de Ca^{2+} ATPase e Mg^{2+} ATPase, enquanto Eu^{3+} e Tb^{3+} inibem a calcineurina [41].

Em baixas concentrações os íons lantanídeos podem inibir a produção de radicais livres de oxigénio [41].

Também podem ser encontrados níveis anormais de terras raras nas unhas, o que sugere a absorção das mesmas através do pulmão [41].

O cabelo pode ser utilizado como biomarcador para detetar a presença de terras raras no organismo humano. Alguns estudos revelam que indivíduos que se encontram mais próximos de áreas de mineração de terras raras, contêm uma maior concentração das mesmas no cabelo, em comparação com indivíduos que se encontram em áreas mais distantes [41].

9.3 Carcinogénese das Terras Raras

Alguns estudos têm demonstrado que os lantanídeos podem promover a proliferação celular e induzir apoptose, dependendo das espécies de Ln, concentração e tipos celulares.

Os iões destes elementos podem bloquear diferentes canais de cálcio em células humanas, visto que podem substituir ou serem antagonistas do Ca^{2+} durante reações nucleares, devido à semelhança dos seus raios iónicos. Nos eritrócitos humanos, os catiões de Ln podem ligar-se à membrana, aumentando assim, a permeabilidade celular, que dependendo do composto de Ln vão provocar alterações morfológicas.

10. CABELO COMO AMOSTRA BIOLÓGICA DE ESTUDO

Tendo sido o cabelo a amostra biológica utilizada no presente trabalho experimental decidiu-se apresentar breves conceitos importantes acerca da mesma.

O cabelo é uma amostra biológica utilizada para a deteção de diversas substâncias químicas há mais um de século atrás [43]. Em 1858, Hoppe publicou os resultados da primeira análise de cabelo, relativas à deteção de arsénio em cadáveres exumados (onze anos após a sua sepultura). Foi durante as décadas de 60 a 70 que o cabelo começou a ser utilizado para avaliar a exposição a metais pesados tóxicos, nomeadamente, arsénio, chumbo e mercúrio. Em algumas figuras históricas, também foram efetuadas análises de cabelo, tais como Ludwig van Beethoven, William Butler Yeats e Napoleão Bonaparte.

Durante a colheita de amostras de cabelo, a área de recolha deve ser preferencialmente no meio da cabeça ou na nuca. E esta deve ser realizada de modo a não causar danos estéticos ao indivíduo.

Esta matriz tem a vantagem de ser de fácil colheita, transporte e preservação, pois as amostras de cabelo são estáveis por um elevado período de tempo. Para além disso, ao utilizar o cabelo como matriz, é possível obter uma segunda amostra similar e correspondente à amostra colhida inicialmente, caso seja necessário realizar uma análise posterior. No entanto, a maior vantagem do cabelo em relação às restantes matrizes biológicas, é o facto de ter um longo período de deteção dos metabolitos a estudar (meses a anos) [43]. Para além disso, o cabelo permite visualizar o historial de exposição a uma determinada substância, visto que este cresce a uma velocidade razoavelmente constante (0,3-0,4 mm/dia e 0,9 – 1,2 cm/mês) [44].

Quantitativamente o cabelo não é uma via importante de excreção de substâncias químicas, no entanto este pode conter concentrações muito mais elevadas de alguns elementos, em comparação com outros tecidos e fluidos acessíveis. Esta matriz é um indicador da acumulação de certos elementos químicos no tecido celular [45].

Usualmente o cabelo é a amostra utilizada em Toxicologia Forense na determinação de envenenamento, deteção de drogas de abuso, consumo crónico de drogas e violações. Outra aplicação da análise de cabelo é em estudos arqueológicos, pois permite visualizar o estilo de vida dos nossos antepassados.

Contudo, esta amostra tem sido alvo de discussões entre a comunidade científica, visto que alguns mecanismos não se encontram bem definidos e esclarecidos,

nomeadamente, os mecanismos de incorporação e deposição de drogas e a variabilidade dos resultados e procedimentos laboratoriais. Apesar disso, vários investigadores têm proposto o cabelo como matriz biológica alternativa para a deteção de substâncias químicas. A discrepância entre os valores das janelas de deteção entre o cabelo, urina e sangue, cerca de 2-4 dias, permite-nos verificar que para obtermos informações de exposição a curto prazo, a urina e o sangue são as amostras preferenciais, pelo contrário, para exposições a longo prazo a amostra ideal é o cabelo.

11. STRESS OXIDATIVO E CARCINOGENÉSE DOS METAIS PESADOS

Alguns metais pesados como o cádmio, mercúrio, chumbo, arsénio, crómio, níquel e cobalto são classificados como cancerígenos humanos. Contudo, os mecanismos que envolvem a formação de tumores associados a estes metais não se encontram bem esclarecidos [19].

Sabe-se que a exposição crónica a metais pesados aumenta a incidência de cancro em indivíduos expostos. Com a exceção do crómio, a maior parte dos metais são pouco ou nada mutagénicos, no entanto, são a forma mais resistente de poluentes ambientais devido à sua capacidade de se acumularem no ambiente [15].

Quando um indivíduo encontra-se exposto a metais pesados, devido à sua toxicidade, vão-se desenvolver processos de inflamação, que com a continuidade de exposição vão acabar por originar uma inflamação crónica. Esta por sua vez, induz a produção de *stress* oxidativo que está relacionado com o desenvolvimento tumoral. Estes processos serão desenvolvidos de seguida mais pormenorizadamente.

O processo de inflamação é um mecanismo de defesa essencial no nosso organismo, sendo que este processo consiste na resposta fisiológica protetora que ocorre nos tecidos vascularizados na sequência de uma lesão tecidular.

Os principais objetivos deste processo são eliminar a causa inicial da lesão celular, remover células necróticas e tecidos, e iniciar o processo de reparação. Além disso, os processos de inflamação são capazes de destruir micróbios, mas também podem causar lesões em tecidos normais. As células inflamatórias sanguíneas que participam no processo inflamatório são os neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas. No entanto também participam neste processo células inflamatórias nos tecidos, nomeadamente, macrófagos, fibroblastos e mastócitos.

Quando a inflamação é de duração prolongada (semanas a anos), surge a inflamação crónica, caracterizada por diversas reações, nomeadamente, infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas), destruição tecidular por células inflamatórias e reparação com angiogénese e fibrose [46].

A inflamação crónica pode surgir através de infeções persistentes por micróbios difíceis de erradicar, doenças inflamatórias imuno-moduladas (doenças de hipersensibilidade), exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, e no caso de alguns cancros, no qual reações inflamatórias promovem o desenvolvimento do tumor [46].

Este tipo de inflamação envolve interações complexas entre várias populações de células e os seus mediadores, nomeadamente, macrófagos, linfócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos [46].

Os macrófagos são as células dominantes na inflamação crónica. Em todos os tecidos, os macrófagos atuam como filtros para partículas em suspensão, micróbios e diversas células. Os macrófagos teciduais podem ser ativados por diversos estímulos para realizarem várias tarefas. As principais vias de ativação dos macrófagos são a ativação de macrófagos clássica e a alternativa [46].

A ativação dos macrófagos pela via clássica é induzida pelos produtos microbianos (endotoxinas), através de sinais provenientes das células T. Os macrófagos que são ativados por esta via produzem enzimas lisossomais, NO e ROS, que aumentam a sua capacidade para matar organismos ingeridos, e segregam ainda, citocinas que estimulam a inflamação. Estes macrófagos são importantes na defesa do hospedeiro contra os micróbios ingeridos e em diversas reações inflamatórias [46].

Em relação a ativação dos macrófagos pela via alternativa, o seu papel principal é reparar os tecidos danificados, uma vez que estes macrófagos segregam fatores de crescimento que promovem a angiogénese, ativam fibroblastos, e estimulam a síntese de colagénio. Pensa-se que, para responder aos estímulos nocivos, inicialmente, os macrófagos são ativados pela via clássica, com o objetivo de destruir o agente agressor. De seguida é então ativada a via alternativa que inicia a reparação dos tecidos, no entanto, esta sequência não se encontra bem documentada para a maioria das inflamações [46].

Os linfócitos são mobilizados sempre que existem infeções, e são os principais condutores da inflamação em diversas doenças autoimunes e crónicas. A ativação dos linfócitos T e B faz parte da resposta imune adaptativa, em infeções e doenças imunológicas [46].

Os linfócitos e os macrófagos interagem de forma bidirecional, e esta interação tem um papel importante na propagação da inflamação crónica. Os macrófagos exibem antigénios para células T, expressam moléculas de membrana, e produzem citocinas que estimulam a resposta das células T. Os linfócitos T ativados, que por sua vez, produzem citocinas, ativam os macrófagos. Esta ativação promove a apresentação de antigénios e aumenta a segregação de citocinas. É este ciclo que sustenta a inflamação crónica [46].

Os eosinófilos são característicos de locais de inflamação, relacionados com infeções parasitárias, e em reações imunológicas mediadas por IgE (imunoglobulina E), normalmente associadas a alergias [46].

Os mastócitos encontram-se amplamente distribuídos pelo tecido conjuntivo e atuam como resposta a inflamações crónicas e agudas [46].

No caso dos neutrófilos, embora a sua presença seja um bom indicador de inflamação aguda, estes também podem atuar na inflamação crónica [46].

A exposição a metais pesados está relacionada com a formação de radicais livres nos seres vivos [17, 47]. O *stress* oxidativo é a acumulação de radicais livres, tais como ROS e RNS que provocam um desequilíbrio celular que pode originar carcinogénese [38].

O *stress* oxidativo resultante da exposição aos metais pesados pode originar um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do sistema para desintoxicar intermediários reativos. Isto pode resultar em lesões no DNA, peroxidação lipídica, modificação de proteínas e desencadear várias doenças, tal como o cancro [19].

A estimulação oncogénica está relacionada com a desregulação de vias de proteção e com a deficiência de reparação de DNA [19].

O potencial cancerígeno de cada metal pesado vai depender do seu estado de oxidação, solubilidade e forma complexa [19].

Os iões dos metais tóxicos possuem propriedades semelhantes (como por exemplo, carga e tamanho) aos iões essenciais. Por estas razões, os iões dos metais competem com os locais de ligação biológicos dos iões essenciais, isto vai provocar uma perturbação na estrutura e na função biomolecular, assim como uma perturbação da homeostasia do metal [19].

O mecanismo de ação da carcinogénese induzida pelos metais pode-se resumir em (1) indução de *stress* oxidativo e lesões nos componentes celulares, em específico no DNA, (2) interferência nos sistemas de reparação de DNA, provocando uma instabilidade genómica, (3) interrupção do crescimento e proliferação celular através de vias de sinalização, e desregulação de oncogenes ou genes supressores de tumores [19].

Como já foi referido anteriormente, o fenómeno de *stress* oxidativo pode explicar a genotoxicidade e a mutagenicidade induzida pelos metais. Estes metais induzem a produção de ROS (por exemplo, radicais superóxido), e RNS (por exemplo, óxido nítrico)

em seres vivos. Estes radicais provocam lesões oxidativas no DNA, proteínas e lípidos [19].

O *stress* oxidativo não só facilita a iniciação do tumor através da mutagênese, como destrói atividades celulares de enzimas antioxidantes através da interação com os grupos tiol, que desregulam o crescimento e proliferação celular, levando à promoção do tumor. Isto depende do grau e duração da exposição ao metal[19].

O *stress* oxidativo não é o único fator que contribui para que os metais pesados induzam carcinogênese, mas é considerado um elemento importante na transformação maligna [19].

O desenvolvimento de um tumor está associado à desregulação do crescimento e diferenciação celular. No caso dos metais capazes de provocar carcinogênese, estes interferem com o crescimento celular através de mecanismos específicos, tais como, mudanças na expressão de fatores de crescimento e incapacidade de regular o crescimento celular [19].

Alguns metais promovem diversas vias, tais como proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*). Isto implica a ativação de fatores de transição nucleares, tais como AP-1 (*Activator Protein-1*), NF- κ B, proteína p53, NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*), e HIF-1 (*Hypoxia-inducible Factor-1*), que regulam a expressão de genes citoprotetores importantes na reparação de DNA, resposta imune, paragem do ciclo celular e apoptose. Os metais pesados e ROS interagem com grupos tiol em vários tipos de fosfatases, tais como serina/treonina, fosfotirosina e fosfolípidios, que são oxidados para formar pontes de dissulfureto [48].

Isto origina alterações na conformação de certas proteínas que regulam várias cascatas de sinalização, ativando assim determinados fatores de transcrição. O fator de transcrição nuclear AP-1 é fundamental no crescimento celular e na apoptose. A atividade de AP-1 é induzida pela proteína cinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38 MAPK (p38 Mitogen-activated Protein Kinases) [19].

O fator nuclear NF- κ B tem uma função importante em diversos processos, nomeadamente, na resposta inflamatória e na transformação e sobrevivência celular. A ativação deste fator está associada a carcinogênese e pode ser ativado por fatores externos, tais como metais pesados [49].

A influência dos metais e das ROS na ativação de NF- κ B é apoiada pelo facto da ativação de diversos estímulos ser bloqueada por alguns antioxidantes, nomeadamente, tióis e vitamina E [50].

Alguns metais, como níquel, podem causar mutações no gene p53. As mutações neste gene estão ligadas à maioria dos cancros humanos. O fator nuclear de células T ativadas (NFAT) controla a produção de citocinas, crescimento e diferenciação muscular e angiogénese. Alguns metais podem ativar o NFAT através de uma via dependente de cálcio e através da formação de peróxido de hidrogénio [19].

O HIF-1 controla a homeostase do oxigénio através de vários genes relacionados com o cancro, tal como, heme oxigenase I e o fator de crescimento endotelial vascular [51]. Os metais pesados podem ativar o HIF-1 [19].

Determinadas proteínas de zinco, designadas de *zinc finger* podem ser consideradas um biomarcador para avaliação de risco de exposição ambiental e ocupacional a metais cancerígenos. Estes metais têm a capacidade de inibir estas proteínas, provocando uma distorção dos seus domínios e consequentemente uma disfunção das proteínas [19].

12. OBJETIVO

A dificuldade do organismo humano em erradicar os metais pesados aos quais é exposto faz com que seja imperativo esclarecer qual o impacto destes a longo prazo. Trata-se de facto, de um caso importante de saúde pública com relevância para o futuro de uma sociedade industrializada com elevada prevalência destes mesmos metais.

Posto isto, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a presença de metais pesados em ex-combatentes da guerra do ultramar. Neste grupo inclui-se indivíduos que estiveram expostos a metais pesados e apresentam estilhaços no organismo. Esta avaliação foi efetuada através de amostras de cabelo pela técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento acoplada à Microanálise de Raios-X. Desta forma procurou-se averiguar a possibilidade em detetar estes estilhaços remanescentes através de análises ao cabelo.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Técnica de Microscopia Eletrônica de Varrimento Acoplada à Microanálise por Raios-X:

As características físicas e químicas das superfícies dos materiais determinam certas propriedades (mecânicas, químicas, térmicas, elétricas e óticas) e restringem as suas potencialidades de aplicação tecnológica.

Para estudar a microestrutura de materiais, as técnicas utilizadas são a microscopia ótica e eletrônica. A microscopia ótica possui várias limitações, sendo, atualmente mais utilizada a microscopia eletrônica.

Os microscópios eletrônicos são instrumentos que permitem observar e caracterizar um material com base nas radiações resultantes da interação com um feixe de elétrons.

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) e de varrimento (MEV) são os dois tipos de microscópios utilizados para analisar pormenorizadamente os materiais.

No caso do MET, este é constituído por um conjunto de lentes eletromagnéticas que controlam um feixe de elétrons. Este microscópio possui lentes eletromagnéticas e aberturas situadas ao longo do feixe eletrónico [52].

O MEV é um versátil instrumento utilizado para observar e analisar características micro estruturais de materiais sólidos. Este é constituído pelos seguintes componentes: canhão de elétrons, lentes eletrônicas, compartimento da amostra, detetor para todos os sinais de interesse, dispositivos de imagem e dados. O MEV fornece imagens na gama de ampliações da ordem de x10 a x500 000 e utiliza feixes de elétrons para a produção de imagens. O princípio de funcionamento deste microscópio consiste em efetuar um varrimento na superfície da amostra através de um feixe eletrónico que se encontra finamente focado. Num monitor obtém-se a respetiva imagem, sendo que em cada ponto, o brilho é determinado pela intensidade das radiações emitidas da superfície. Neste microscópio é possível obter-se a uma correspondência, ponto a ponto, entre a imagem e a região da amostra analisada. Estas imagens podem fornecer informações acerca da topografia, composição química (n° atómico), estrutura cristalina e composição elementar, caso o microscópio esteja associado a um espectrómetro de raios-X. Estas informações dependem das características da amostra e da interação da mesma com o feixe

eletrónico. Para realizar as imagens, o MEV utiliza detetores especializados que se encontram próximos da amostra e medem a intensidade de emissão da mesma. Os detetores podem ser de dois tipos, detetores de eletrões secundários ou de baixa energia ($E < 50$ eV), e detetores de eletrões retrodifundidos ou de energia elevada (limite igual à do feixe primário). O modo mais comum da deteção de eletrões é a deteção de eletrões secundários (ES). Este tipo de eletrões fornecem imagens com informações acerca da topografia da amostra e a emissão dos eletrões varia consoante o número atómico (Z) do material. As imagens obtidas a partir dos eletrões secundários assemelham-se às imagens habituais da observação visual e permite efetuar uma interpretação intuitiva das superfícies celulares [52].

Tal como os ES, nos eletrões retrodifundidos (ER), a intensidade da emissão da energia detetada é crescente com o ângulo de incidência na amostra, por esta razão as imagens têm um elevado contraste topográfico. Se isto se encontrar acoplado à microanálise, é possível estudar a composição elementar do material (sendo possível determinar o conteúdo no interior das células). É necessário que o microscópio se encontre associado a um espectrómetro de raios-X para uma melhor visualização e interpretação da informação acerca da topografia e composição elementar do material. A microanálise por raios-X é efetuada por Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios-X (EDS). O sistema EDS de deteção acoplado ao microscópio permite detetar, desde que numa concentração superior a 0,1-0,3% em massa a presença de metais pesados numa amostra. A microanálise por Raios-X é um processo de caracterização química de um microvolume de material que se fundamenta na análise do espectro de emissão local de raios-X, e utiliza um feixe de eletrões como radiação primária ionizante [52].

Para a elaboração deste trabalho foi utilizado o equipamento do CEMUP (Centro de Materiais da Universidade do Porto), JEOL-6301F acoplado com Noren Voyager X-ray com sistema EDS de deteção onde foi possível obter espectros de microanálise qualitativos e semi-quantitativos das zonas focadas a eletrões retrodifundidos; para além da visualização topográfica da superfície do cabelo a eletrões secundários.

Pela aplicabilidade desta técnica na identificação de metais pesados e terras raras em diferentes tipos de amostras esta metodologia aqui apresentada adquire uma forte importância médico-legal.

RESULTADOS

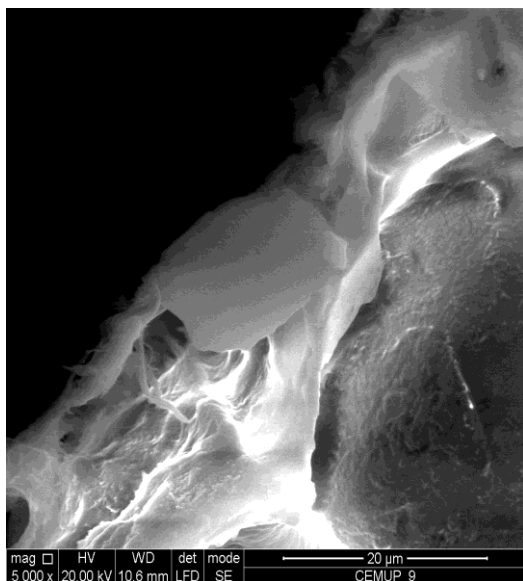


Fig.1.1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, onde é visível uma imagem de elétrons secundários ampliada 5000x cuja imagem refere-se a uma amostra de cabelo.

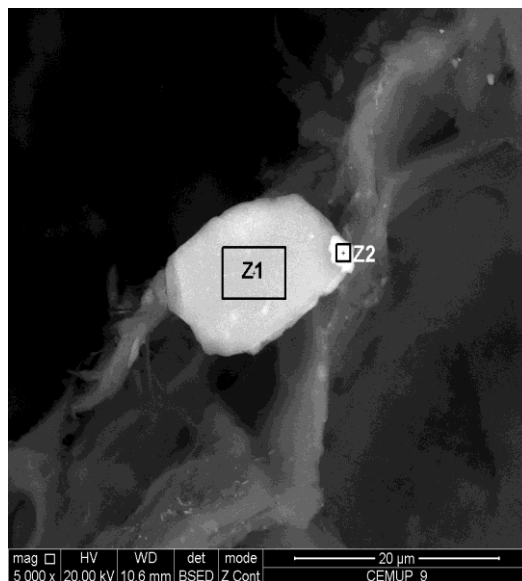


Fig.1.2. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, na versão de elétrons retrodifundidos onde os pontos brilhantes são característicos da presença de um metal pesado.

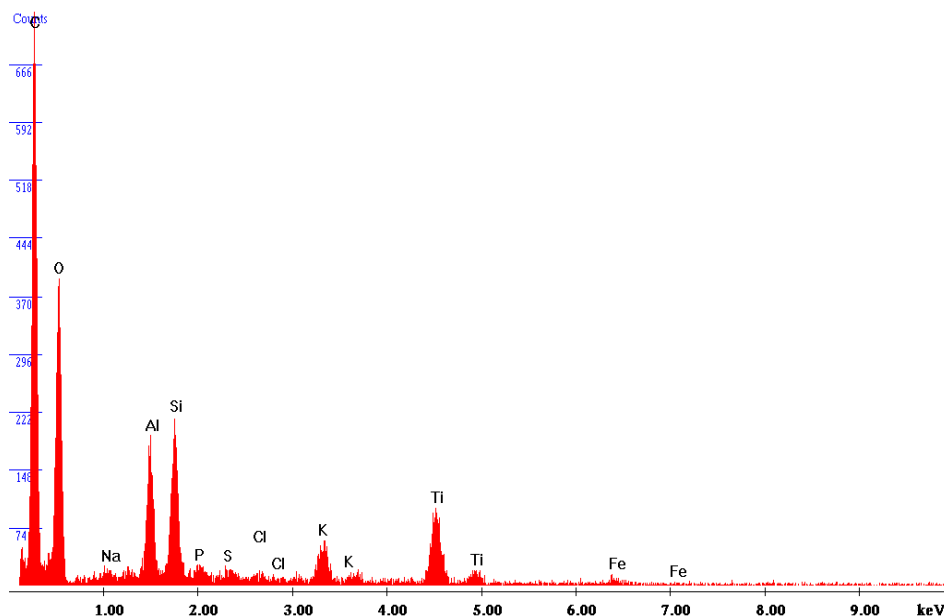


Fig.1.3. Espectro de Microanálise de Raios-X, que evidência a análise de Z1, onde é possível identificar a presença de Titânio (Ti), Silício (Si) e Alumínio (Al).

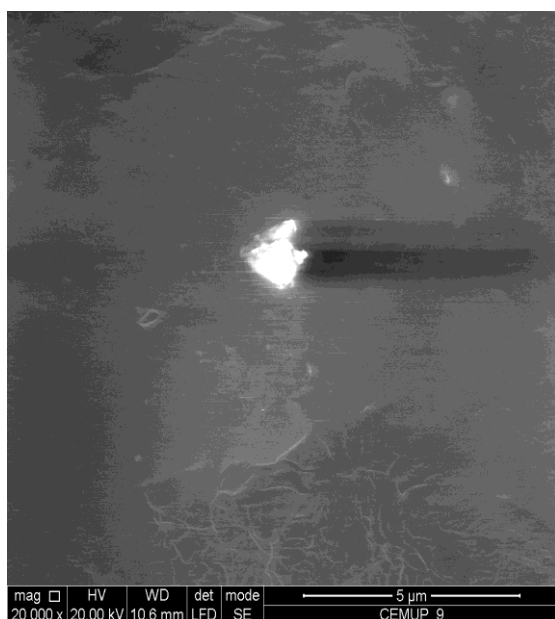


Fig.2.1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, onde é visível uma imagem de elétrons secundários ampliada 20000x cuja imagem refere-se a uma amostra de cabelo.

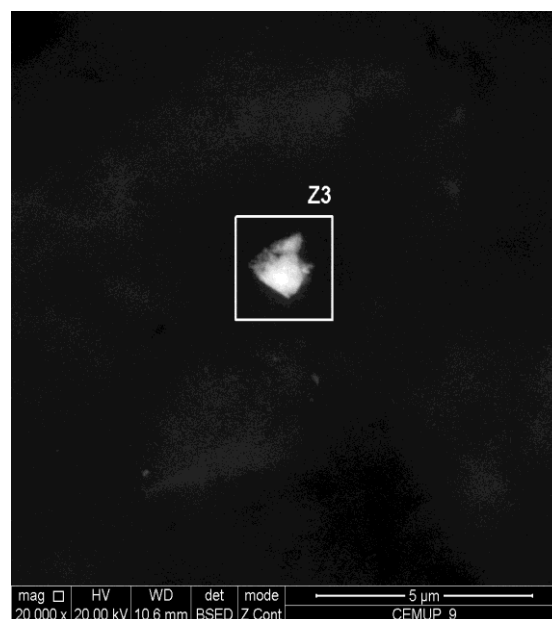


Fig.2.2. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, na versão de elétrons retrodifundidos onde os pontos brilhantes são característicos da presença de um metal pesado.

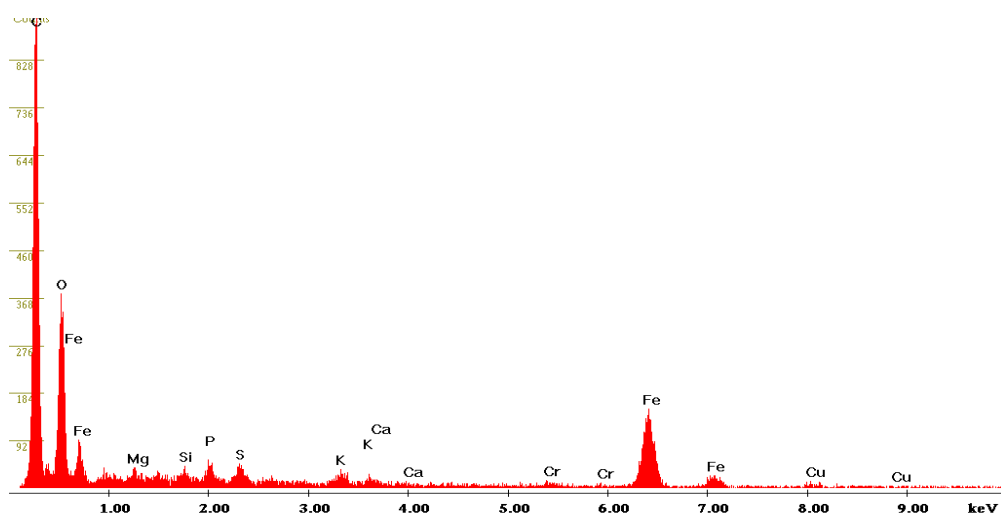


Fig.2.3. Espectro de Microanálise de Raios-X, que evidência a análise de Z3, onde é possível identificar a presença do metal pesado Crômio (Cr) e Ferro (Fe).

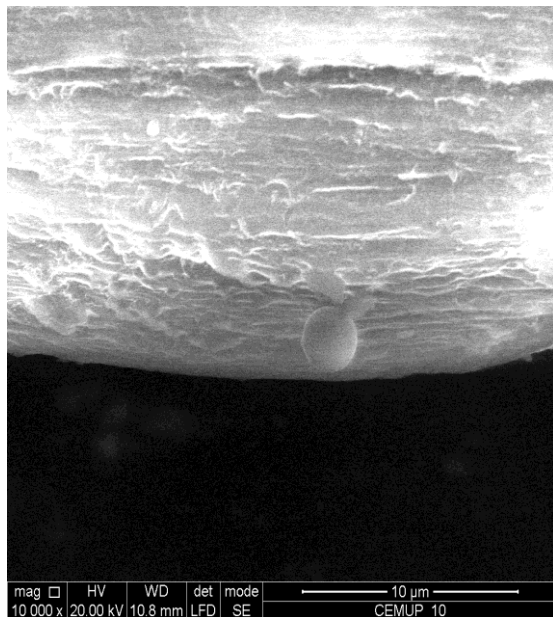


Fig.3.1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, onde é visível uma imagem de elétrons secundários ampliada 10000x cuja imagem refere-se a uma amostra de cabelo.

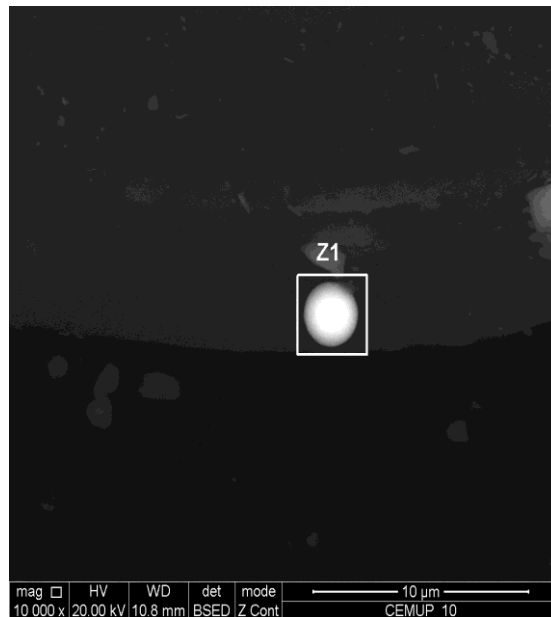


Fig.3.2. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varrimento, acoplada à Microanálise por Raios-X, na versão de elétrons retrodifundidos onde os pontos brilhantes são característicos da presença de terras raras.

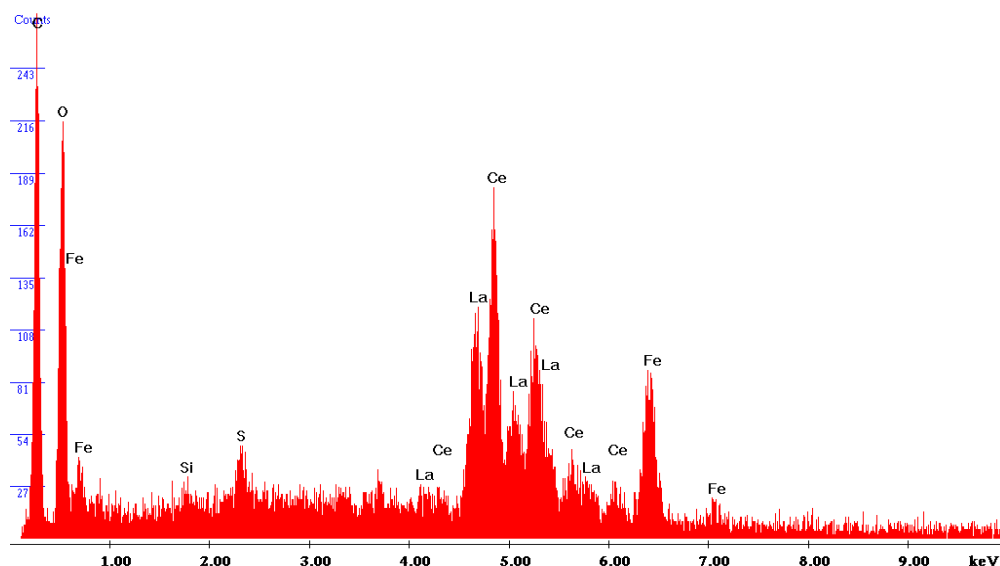


Fig.3.3. Espetro de Microanálise de Raios-X, que evidência a análise de Z1, onde é possível identificar a presença de Terras Raras, nomeadamente, Cério (Ce) e Lantânio (La).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os metais pesados são contaminantes ambientais com propriedades tóxicas para os seres vivos. O Homem encontra-se exposto a estes compostos há mais de 5000 anos, e atualmente devido ao aumento progressivo da poluição ambiental e ocupacional esta situação tende a piorar. A exposição ocupacional e ambiental aos metais é responsável pelo aparecimento de algumas doenças em vários sistemas, nomeadamente, pulmonar, imunológico, neurológico, renal, endócrino, cardiovascular e reprodutor. O Homem atualmente encontra-se exposto a uma poluição silenciosa, colocando em risco a própria Saúde Pública.

O objetivo deste trabalho foi estudar a possível relação entre a exposição crónica de metais pesados e terras raras em indivíduos que pela sua atividade profissional estiveram em contato com estes materiais, com o possível aparecimento de carcinogénese (processos clínicos dos mesmos). Para a concretização deste objetivo foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) acoplada à Microanálise de Raios-X (XRM) (SEM-XRM).

Com esta técnica, foi possível qualificar e semi-quantificar os metais e terras raras presentes na amostra em estudo, neste caso o cabelo. A Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) acoplada à Microanálise de Raios-X (XRM) (SEM-XRM) permitiu identificar numa concentração superior a 0,1-0,3% em massa.

Uma vez que os metais pesados e terras raras possuem um elevado número atómico, foi possível identificar “in situ” a presença destes compostos em imagens fornecidas pelo microscópio eletrónico.

Com esta técnica (SEM-XRM) é possível observarmos nas imagens de eletrões retrodifundidos os metais pesados e terras raras, pois estes aparecem representados pelas áreas brancas. A identificação do composto é realizada pela microanálise de raios-X que fornece um espectro com a respetiva identificação.

No estudo deste grupo, os resultados indicam a presença de metais pesados e terras raras nas amostras analisadas. Estes resultados indicam exposição crónica deste grupo de risco a metais pesados e terras raras o que poderá potenciar processos inflamatórios (já descritos na bibliografia) e desse modo, desenvolver mecanismos de carcinogénese, pelos mecanismos também já largamente estudados e postulados.

Assim, os nossos resultados completam os resultados publicados em 2011 por Koedrith *et al.*. Estes autores classificam alguns metais pesados (por exemplo, arsénio, cádmio, chumbo, mercúrio, etc.), como cancerígenos que afetam a saúde do Homem através da exposição ambiental e ocupacional aos mesmo. Estudaram também de que forma o *stress* oxidativo resultante da exposição a metais pesados pode originar um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de um sistema para desintoxicar intermediários reativos. Deste desequilíbrio podem resultar diversas lesões, nomeadamente, o cancro.

Os resultados de um outro estudo, publicado em 2006 por Valko *et al.*, demonstraram que o *stress* oxidativo induz desequilíbrio celular. Esse desequilíbrio encontra-se presente em diversas células cancerígenas em comparação com células normais, onde não se observa desequilíbrio celular. Este desequilíbrio pode estar relacionado com a estimulação oncogénica.

Foi já estudado por Jomova *et al.*, em 2011, que o fato dos metais induzirem a formação de radicais livres e outras espécies reativas é um fator comum para determinar a toxicidade e carcinogénese induzida por estas substâncias.

Os resultados apresentados neste trabalho vão de encontro ao já descrito na bibliografia internacional, mostrando pela aplicação desta técnica inovadora que um processo inflamatório crónico origina um estado de *stress* oxidativo celular e consequente, carcinogénese.

Os nossos resultados vieram assim confirmar o já anteriormente descrito, contribuindo com informação original acerca da possível oncogénese/carcinogénese induzida pelos metais pesados, num grupo específico de grande relevância para a população portuguesa.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

A utilização da técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) acoplada à Microanálise de Raios-X (XRM) (SEM-XRM) permitiu de forma original e inequívoca, utilizando o cabelo como vestígio biológico de estudo, detetar a presença de metais pesados e terras raras.

Pode-se concluir com este estudo, que uma exposição prolongada a metais pesados e terras raras está relacionada com processos de inflamação crónica, que através do *stress* oxidativo causado, induzem fenómenos de carcinogénese (já descritos na bibliografia).

O objetivo deste trabalho foi verificado, visto que ficou demonstrado, se bem que de uma forma ainda preliminar, que existe uma relação entre a exposição prolongada a metais pesados, e o seu aparecimento no cabelo, o que nos indica que os metais continuam em circulação, potenciando mecanismos de cascata inflamatória e ativação de oncogenes (já largamente estudado e descrito).

Este trabalho é mais uma informação e um contributo original para a relação entre os metais pesados/ processos de inflamação e consequentemente os mecanismos de carcinogénese, aplicada a uma população com características particulares e que abrange grande parte da população masculina portuguesa com idades compreendidas entre 60 e 70 anos.

PERSPETIVAS FUTURAS

PERSPETIVAS FUTURAS

Como perspetivas futuras neste trabalho poder-se-á propor a utilização da técnica Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) acoplada à Microanálise de Raios-X (XRM) (SEM-XRM) em outros grupos de risco, aplicando-se assim esta técnica ao estudo das Doenças Profissionais e consequentemente à Implicação Médico-Legal.

Posteriormente poderia ter interesse a comparação das fichas clínicas dos trabalhadores expostos e verificar se algum deles apresenta alguma doença crónica específica de um determinado metal, como por exemplo, o saturnismo no caso de uma exposição crónica ao chumbo, compatível com os resultados obtidos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Magalhães CC. (2010) Importância Médico-Legal dos Metais Pesados no Desenvolvimento Infantil. Tese de Mestrado em Medicina Legal. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
2. Silva C. (2010) Os enfermeiros e a preservação de vestígios perante vítimas de agressão sexual, no serviço de urgência. Tese de Mestrado em Medicina Legal. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
3. Calabuig J, Cañadas E. (2004) Medicina legal y toxicología. 6.^a edición. Ed. Masson.
4. Costa J. (2009) Curso Básico de Medicina Legal.
5. Galvão R. (2009) Medicina legal - definição - histórico - relações - divisão. Disponível em: <http://ronaldo79171.blogspot.pt/2009/08/medicina-legal-definicao-historico.html>. Acesso em: 22/09/2013.
6. Magalhães T. (2003) Introdução à Medicina Legal. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
7. Rangel R. (2003) Noções Gerais sobre outras ciências forenses. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
8. Carvalho G. (2007) Toxicologia Forense. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto: Resumos da unidade curricular de Toxicologia Forense.
9. Klaassen C. (2007) Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Seventh Edition. McGraw-hill.
10. Magalhães T. (2003) Clínica Médico-Legal. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
11. Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M. (2013) Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 17:2198-2206.
12. Duffus JH. (2002) "Heavy metals"- A meaningless term? (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 74(5):793-807.
13. Jarup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. British Medical Bulletin. 68:167-182.
14. Lee DH, Lim JS, Song K, Boo Y, Jacobs Jr. DR. (2006) Graded Associations of Blood Lead and Urinary Cadmium Concentrations with Oxidative-Stress-Related Markers in the U.S. Population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Environmental Health Perspectives. 114(3):350-354.

15. Martinez-Zamudio R, Ha HC. (2011) Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*. 6(7):820–827.
16. Jarup L, Berglund M, Elinder CG, Nordberg G, Vahter M. (1998) Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health*. 24:1 - 51.
17. Jomova K, Valko M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283:65–87.
18. Seidal K, Jorgensen N, Elinder CG, Sjögren B, Vahter M. (1993) Fatal cadmium-induced pneumonitis. *Scand J Work Environ Health*. 19(6):429-431.
19. Koedrich P, Seo YR. (2011) Advances in Carcinogenic Metal Toxicity and Potential Molecular Markers. *International Journal of Molecular Sciences*. 12:9576-9595.
20. World Health Organization - International Agency for Research on Cancer. (1997) Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. Vol. 58.
21. Chakraborty PK, Lee W, Molitor M, Wolff NA, Thévenod F. (2010) Cadmium induces Wnt signaling to upregulate proliferation and survival genes in sub-confluent kidney proximal tubule cells. *Chakraborty et al. Molecular Cancer*. 9:102.
22. Cunha EM, Silva DP, Águas AP. (2003) High-resolution identification of mercury in particles in mouse kidney after acute lethal exposure. *BioMetals*. 16:583-590.
23. Cunha EM. (2008) Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos. Dissertação de Doutoramento em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
24. Lee R, Middleton D, Caldwell K, Dearwent S, Jones S, Lewis B, et al. (2009) A review of events that expose children to elemental mercury in the United States. *Environ Health Perspect*. 117(6):871-878.
25. Vasconcelos IC. (2011) Pesquisa de mercúrio e outros metais em dentes restaurados a amálgama pelo método de SEM-XRM. Considerações Médico-Legais. Tese de Mestrado em Medicina-Legal. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.
26. Matos A, Morais L, Martins M. (2014) Selénio. Disponível em: http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g1_mercurio/seleni.html. Acesso em: 08/02/2014.
27. Gidlow DA. (2014) Lead toxicity. *Occupational Medicine*. 54:76 - 81.
28. Sousa JM. (2010) Exposição a metais pesados no ambiente de trabalho: estabelecimento de bioindicadores de exposição a poluentes. Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

29. Zhang A, Hu H, Sánchez BN, Ettinger AS, Park SK, Cantonwine D, et al. (2012) Association between Prenatal Lead Exposure and Blood Pressure in Children. *Environmental Health Perspectives*. 120(3):445-450.
30. Patrick L. (2006) Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Alternative Medicine Review*. 11(2):114-27.
31. Reyes JL, Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Bautista-García P, Debray-García Y, Namorado M. (2013) Tight Junction Proteins and Oxidative Stress in Heavy Metals-Induced Nephrotoxicity. *BioMed Research International*.
32. Vaziri ND. (2008) Mechanisms of lead-induced hypertension and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295(2):454-65.
33. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. (2007) Lead Exposure and Cardiovascular Disease—A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives*. 115(3):472-482.
34. Gomez-Caminero A, Howe P, Hughes M, Kenyon E, Lewis DR, Moore M, et al. (2001) Arsenic and Arsenic Compounds. *Environmental Health Criteria*. 224
35. Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD. (2006) Methylated Arsenicals: The Implications of Metabolism and Carcinogenicity Studies in Rodents to Human Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology*. 36(2):99–133.
36. Salnikow K, Zhitkovich A. (2008) Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic, and Chromium. *Chem. Res. Toxicol*. 21(1):28–44.
37. Kamat CD, Green DE, Curilla S, Warnke L, Hamilton JW, Sturup S, et al. (2005) Role of HIF Signaling on Tumorigenesis in Response to Chronic Low-Dose Arsenic Administration. *Toxicological Sciences*. 86(2):248–257.
38. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1):1-40.
39. World Health Organization - International Agency for Research on Cancer. (2004) Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic. Vol.84.
40. Palasz A, Czekaj P. (2000) Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochimica Polonica*. 47(4):1107–1114.
41. Rim KT, Koo KH, Park JS. (2013) Toxicological Evaluations of Rare Earths and Their Health Impacts to Workers: a Literature Review. *Safety and Health at Work*. 4(1):12-26.
42. Redling K. (2006) Rare Earth Elements in Agriculture with Emphasis on Animal Husbandry. Inaugural-Dissertation Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung der Ludwig-Maximilians. Universität München.

43. Lima EC, Silva CL. (2007) Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso. NewsLab.
44. Campos RC, Piveta F. Métodos de Coleta e Análise de Amostras de Sangue, Urina e Cabelo para Dosagem de Teores de Mercúrio.
45. Duarte RP, Pasqual A. (2000) Avaliação do Cádmio (cd), Chumbo (pb), Níquel (ni) e Zinco (zn) em solos, plantas e cabelos humanos. Energia na Agricultura. 15(1):46-58.
46. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. (2012) Robbins Basic Pathology. 9th edition. Ed. Elsevier Health Sciences
47. Rahman K. (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clinical Interventions in Aging. 2(2):219-236.
48. Thannickal VJ, Fanburg BL. (2010) Reactive oxygen species in cell signaling. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol. 279(6):L1005–L1028.
49. Amiri KI, Richmond A. (2005) Role of nuclear factor- κ B in melanoma. Cancer Metastasis Rev. 24(3):301–313.
50. Hughes G, Murphy MP, Ledgerwood EC. (2005) Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor κ B to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. Biochemical Journal. 389:83-89.
51. Semenza GL. (2000) HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J. Appl. Physiol. 88:1474-1480.
52. Sá CP. (2008) Caracterização Morfológica Microestrutural e Microanalítica de Materiais: Microscopia Eletrônica de Varrimento - SEM; Microanálise por Raios-X - EPMA: EDS/WDS.

